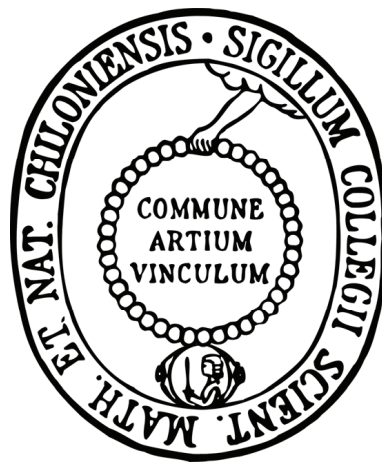


Untersuchung einiger ungewöhnlicher
Aquaporine aus *Salinispora tropica*, *Toxoplasma*
gondii, *Eimeria tenella* und *Plasmodium*
falciparum



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Jie Song
Kiel, 2012

Referent:

Prof. Dr. Eric Beitz

Korreferent:

Prof. Dr. Edmund Maser

Tag der mündlichen Prüfung:

20.06.2012

Zum Druck genehmigt:

20.06.2012

Gez. Prof. Dr. Lutz Kipp
(Dekan)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einteilung der Aquaporine	1
1.2	Struktur der Aquaporine	2
1.2.1	NPA-Region	3
1.2.2	aromatische/Arginin-Region (ar/R-Region)	4
1.3	Ungewöhnliche Aquaporine aus <i>Salinispora tropica</i>	5
1.3.1	<i>Salinispora tropica</i> und dessen Aquaporine	5
1.3.2	Arsenatreduktasen, Aquaglyceroporine und Arsen-Detoxifikation	5
1.3.3	Zielsetzung der Arbeit	11
1.4	Ungewöhnliche Aquaporine aus <i>Eimeria tenella</i> und <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.4.1	<i>Eimeria tenella</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> und deren Aquaporine	12
1.4.2	Zielsetzung der Arbeit	13
1.5	Ungewöhnliches Aquaglyceroporin PfAQP aus <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.5.1	<i>Plasmodium falciparum</i> und dessen Aquaglyceroporin PfAQP	14
1.5.2	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material	17
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.2	Plasmide	20
2.3	Oligonukleotide (Primer)	23
2.3.1	Sequenzierungsprimer	23
2.3.2	Klonierungsprimer	23
2.3.3	Primer zur Konstruktion und Verifizierung des <i>E. coli</i> -Knockouts	24
2.4	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	25
2.5	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	25
2.6	Puffer und Lösungen	26
2.6.1	Puffer und Lösungen für Molekularbiologie	26
2.6.2	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	26
2.6.3	Puffer und Lösungen für Proteinchemie	28
2.6.4	Puffer und Lösungen für funktionelle Charakterisierung	30
3	Methoden	33
3.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1	Isolierung der genomischen DNA aus <i>S. tropica</i>	33
3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	35
3.1.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
3.1.5	DNA-Aufreinigung	36
3.1.6	Phenol/Chloroform Extraktion	36
3.1.7	Ethanol-Fällung von DNA	37
3.1.8	Konzentrationsbestimmung von DNA	37
3.1.9	Restriktionsverdau von DNA	37
3.1.10	5'-DNA-Phosphorylierung	38
3.1.11	5'-DNA-Dephosphorylierung	38
3.1.12	Ligation von DNA	38
3.1.13	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.1.14	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.1.15	Blau-Weiß-Selektion	40
3.1.16	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Miniprep)	41
3.1.17	DNA-Sequenzierung	41
3.1.18	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> (LiAc-Methode)	43
3.1.19	Dauerkultur von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	43
3.2	Proteinchemische Methoden	44
3.2.1	Heterologe Expression der Proteine in <i>E. coli</i>	44
3.2.2	Aufschluss von Zellen mit French-Press	44
3.2.3	Aufreinigung der His-getaggten Proteine durch Metallionenaffinitäts- chromatographie unter nativen Bedingungen	44
3.2.4	Dialyse	45
3.2.5	TCA-Fällung	45
3.2.6	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	45
3.2.7	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. tropica</i>	46
3.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
3.2.9	SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.2.10	Immundetektion	47
3.2.11	Herstellung der Antikörperseren	48
3.2.12	Aufreinigung der Antikörperseren durch Affinitätschromatographie	49
3.3	Methoden zur funktionellen Charakterisierung	51
3.3.1	Wachstumsassay von <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> auf Agarplatten	51
3.3.2	Direkter Arsenit-Aufnahme-Assay	57
3.3.3	Leitfähigkeitsmessung mit der Stopped-Flow-Apparatur	58
3.3.4	Enzymatische Assays	63
3.4	Konstruktion der Klonierungsarbeiten und der bereits subklonierten Plas- mide	64
4	Ergebnisse	67
4.1	Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus <i>S. tropica</i>	67
4.1.1	Sequenzvergleich der Strop634 und Strop1447	67
4.1.2	Ergebnisse der vorherigen Diplomarbeit	71

4.1.3	Vorarbeiten für die funktionelle Charakterisierung von Strop634 und Strop1447	72
4.1.4	Charakterisierung der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447	79
4.1.5	Charakterisierung der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop-1447	82
4.1.6	Charakterisierung der fusionierten Form von Strop634 und Strop-1447	86
4.1.7	Charakterisierung der Strop634 und Strop1447 in <i>S. tropica</i>	88
4.2	Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus <i>T. gondii</i> und <i>E. tenella</i>	96
4.2.1	Sequenzvergleich der TgAQP2 und EtAQP2	96
4.2.2	Funktionelle Charakterisierung von Fusionsproteinen TgAQP2, EtAQP2 und deren Aquaporin-Domänen	99
4.3	Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins aus <i>P. falciparum</i> .	106
4.3.1	Vergleich der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten bei Stopped-Flow-Messung	106
4.3.2	Hemmung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP durch Sorbitol	111
4.3.3	Vergleich der Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten	113
4.3.4	Untersuchung der gemischten Solut-Leitfähigkeit von PfAQP . . .	115
5	Diskussion	119
5.1	Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus <i>S. tropica</i>	119
5.1.1	Physiologische Funktion von Strop634	119
5.1.2	Mögliche physiologische Funktion von Strop1447	123
5.1.3	Ausblick	124
5.2	Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus <i>T. gondii</i> und <i>E. tenella</i>	126
5.2.1	Charakterisierung der TgAQP2 und EtAQP2	126
5.2.2	Ausblick	127
5.3	Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaglyceroporin aus <i>P. falciparum</i> . .	128
5.3.1	Charakterisierung der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung	128
5.3.2	Untersuchung der gemischten Solut-Leitfähigkeit von Glycerol und Harnstoff durch PfAQP	132
5.3.3	Fazit	133
6	Zusammenfassung	135
7	Summary	137
Anhang		139
A.1	DNA- und Proteinsequenz von Strop634	139
A.2	DNA- und Proteinsequenz von Strop1447	141

Inhaltsverzeichnis

A.3 DNA- und Proteinsequenz von TgAQP2	143
A.4 DNA- und Proteinsequenz von EtAQP2	145
A.5 Parameter für das Kurvenfitting mit Bateman-Funktion in SigmaPlot . .	147
Literaturverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua bidest.	gereinigtes Wasser
ar/R-Region	aromatische/Arginin-Region
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CgArsC	Arsenatreduktase aus <i>C. glutamicum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EcArsC	Arsenatreduktase aus <i>E. coli</i>
EcGlpF	<i>glycerol facilitator</i> aus <i>E. coli</i>
EcTrx	Thioredoxin aus <i>E. coli</i>
EcTrxR	Thioredoxinreduktase aus <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
HA	Hämagglutinin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Nährmedium für <i>E. coli</i>)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MIP	<i>major intrinsic proteins</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MSH	Mycothiol
MR	Mycothionreduktase
Mrx	Mycoredoxin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Ni ²⁺ -NTA	Nickelnitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

Inhaltsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PfAQP	Aquaglyceroporin aus <i>P. falciparum</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rAQP1	<i>rat</i> AQP1
SaArsC	Arsenatreduktase aus <i>S. aureus</i>
ScAcr2	Arsenatreduktase aus <i>S. cerevisiae</i>
SD-Medium	Synthetisches Dextrose Minimalmedium zur Selektion von transformierten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen
SDS	Natriumlaurylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

1 Einleitung

Alle Prokaryonten und Eukaryonten sind von der Lipidmembran umhüllt. Die Lipiddoppelschicht der Membranen ist eine entscheidende Abgrenzung zwischen dem hydrophilen Zellinneren und dem extrazellulären Raum. Der ständige Austausch von Wasser, Ionen, Nährstoffen und Abfallprodukten des Zellstoffwechsels zwischen den Membranen ist lebensnotwendig für die Zellen.

Neben der Diffusion von kleinen und unpolaren Molekülen durch die Zellmembranen sind Kanäle und Transporter für die großen und polaren Moleküle zuständig. Besonders hat der Transport von Wasser über die Zellmembran eine entscheidende Bedeutung für die Zellen, vor allem um die Homöostase aufrechtzuerhalten. Obwohl das kleine und polare Wassermolekül durch die Membran diffundieren kann, braucht dieser Prozess jedoch eine relativ hohe Aktivierungsenergie ($E_a > 10 \text{ kcal/mol}$). Seit langer Zeit wurde vermutet, dass es noch andere zusätzliche Mechanismen für den Wassermolekültransport gibt, um die hohe Wasserpermeabilität und niedrige Aktivierungsenergie ($E_a < 5 \text{ kcal/mol}$) in manchen Zellen z. B. Erythrozyten oder Zellen im proximalen Tubulus der Niere zu erklären. Erst im Jahr 1992 wurde der Mechanismus für den Wassertransport aufgeklärt, durch die Entdeckung des ersten funktionellen Aquaporins (AQP1) in Erythrocytenmembranen [1]. Inzwischen ist die Familie der Aquaporine auf über 450 Exemplare aus verschiedenen Organismen wie Säugern, Amphibien, Insekten, Pflanzen, Hefen, Protozoen, Bakterien und Archaeobakterien angewachsen und diese Zahl wird fortwährend größer [2].

1.1 Einteilung der Aquaporine

Aquaporine gehören zur Familie der *Major Intrinsic Proteins* (MIP). Je nach ihren Permeabilitätseigenschaften lassen sie sich in zwei Subfamilien unterteilen: orthodoxe Aquaporine und Aquaglyceroporine [3]. Während die orthodoxen Aquaporine wasserspezifische Aquaporine sind und ausschließlich Wassermoleküle durch ihre Pore passieren lassen, können Aquaglyceroporine neben dem Wassermolekül auch einige ungeladene kleine Solute wie Glycerol [4, 5], Harnstoff [6], Ammoniak [7], Arsenit [8] etc. leiten.

1.2 Struktur der Aquaporine

Unter den physiologischen Bedingungen liegen Aquaporine als Homotetramere in der Membran vor, wobei jede der vier Untereinheiten als eigenständige Pore funktioniert [9, 10]. Ob die Zentralspore bei einigen Aquaporinen auch eine Rolle für die Permeabilität einiger Gase wie O_2 und CO_2 spielt, ist noch umstritten [11, 12, 13, 14, 15].

Alle Aquaporin-Monomere weisen eine ähnliche Struktur und Aminosäuresequenz auf. Sie bestehen aus sechs transmembranären Helices, welche durch fünf Schleifen (A-E) miteinander verbunden sind. Die zwei Halbhelices HB und HE befinden sich auf der Schleifen B und E und lagern sich von entgegengesetzten Seiten in der Membran zusammen (s. Abb. 1.1). Der N- und C-Terminus befindet sich jeweils auf der zytoplasmatischen Seite. Die erste und zweite Aquaporinhälfte weist hohe Sequenzähnlichkeiten auf, sodass es postuliert wurde, dass das Aquaporin evolutionär aus einer Genduplikation einer drei-transmembranären Domäne entstanden ist [16].

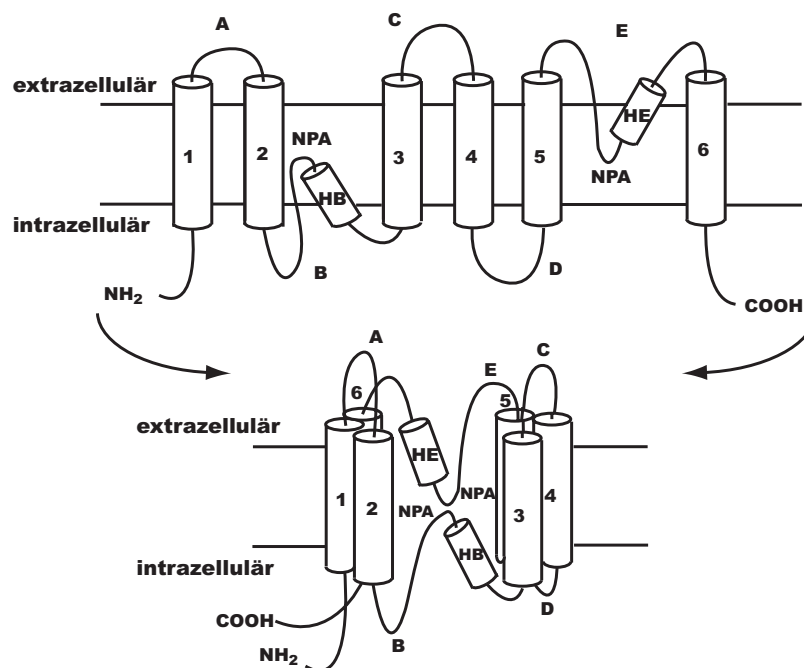


Abbildung 1.1: Schema der Topologie eines Aquaporinmonomers. Die Membranhelices sind als Zylinder dargestellt. Die beiden Halbhelices HB und HE auf der Schleife B und E bilden zusammen eine siebte, geknickte Pseudohelix (unten) und ist umgeben von den sechs Transmembranhelices. Die beiden NPA-Motive sind jeweils auf dem Ende der Halbhelices HB und HE lokalisiert.

1.2.1 NPA-Region

Die NPA-Region auf den Enden der Halbhelices HB und HE (s. Abb. 1.1), die aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin besteht, ist ein charakteristisches Strukturmerkmal der Aquaporine [17, 18, 19]. Das Prolin und Alanin ist bis zu einem gewissen Grad austauschbar, während das Asparagin bislang als essentiell und invariabel gilt [3].

Mit den beiden Asparaginen sind die Enden der beiden Halbhelices positiv geladen, dieses elektrische Feld bewirkt direkt die Orientierung der Wassermoleküle im Kanal. Wasser gelangt in einer *single-file* Anordnung durch das Aquaporin, indem eine Leiter von Carbonylsauerstoffen als Wasserstoffbrückenakzeptoren den Kanal durchzieht [20, 21]. In der NPA-Region durch Wechselwirkung des Sauerstoffs der Wassermoleküle mit den Asparaginwasserstoffen kommt es zu einer 180°-Drehung des Wassermoleküls [22]. Mit dieser Orientierungsänderung verlassen die Wassermoleküle den Kanal (s. Abb. 1.2).

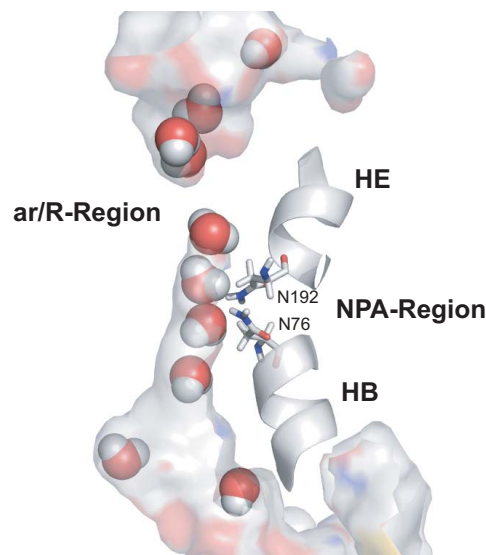


Abbildung 1.2: Darstellung des Kanalbereiches des bovinen AQP1 (nach PDB 1J4N). Die beiden Engstellen ar/R- und NPA-Region sind jeweils am Kanaleingang und in der Kanalmitte lokalisiert. Die Wassermoleküle werden durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Asparaginresten in NPA-Region um 180° gedreht. (Erstellung der Abbildung mit Pymol)

Die NPA-Region bildet eine zentrale Engstelle des Kanals und funktioniert neben dem Größenausschluss auch als eine wichtige Filterregion für den Ausschluss von Kationen [23].

1.2.2 aromatische/Arginin-Region (ar/R-Region)

Der andere wichtige Filterbereich im Aquaporinkanal ist die sogenannte ar/R-Region (aromatische/Arginin-Region). Sie befindet sich zwischen der extrazellulären Mündung des Kanals und NPA-Region und bildet die engste Stelle des Kanals (s. Abb. 1.2). Bei den orthodoxen Aquaporinen beträgt der Durchmesser ca. 2,8 Å [24] und entspricht genau der Größe eines Wassermoleküls. Bei den Aquaglyceroporinen weist ein Durchmesser von 3,4 Å auf, was an den anderen kleinen Soluten wie Glycerol oder Harnstoff angepasst ist [25].

Die ar/R-Region wird normalerweise aus drei oder vier Aminosäuren gebildet. Bei den orthodoxen Aquaporinen z. B. hAQP1 besteht sie aus zum Teil positiv geladenem Arginin (R195), und den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F56), Histidin (H180) und Cystein (C189) [26] (s. Abb. 1.3). Der Einbau eines Histidins ist typisch für die orthodoxen Aquaporine, einerseits begrenzt das Histidin den Kanaldurchmesser, andererseits bildet es mit Arginin eine hydrophile Seite gegenüber dem aromatischen Rest [27]. Die Sulfhydryl-Gruppe von Cystein ragt in den Kanal hinein und dient als die Bindungsstelle für hAQP1-Inhibitor HgCl₂ [28, 29]. Im *E. coli* Aquaglyceroporin EcGlpF besteht die ar/R-Region aus Tryptophan (W48), Glycin (G191), Phenylalanin (F200) und Arginin (R205) (s. Abb. 1.3). Wie auch bei anderen Aquaglyceroporinen wie PfAQP aus *Plasmodium falciparum* (s. Abb. 1.3) ist die ar/R-Region hier hydrophober als im AQP1 wegen des fehlenden Histidins [30] und der Substitution von Cystein durch Phenylalanin [25]. Deshalb lässt EcGlpF Glycerol, kleine Polyole und Harnstoff durch, hat aber geringere Wasser-Permeabilität [27].

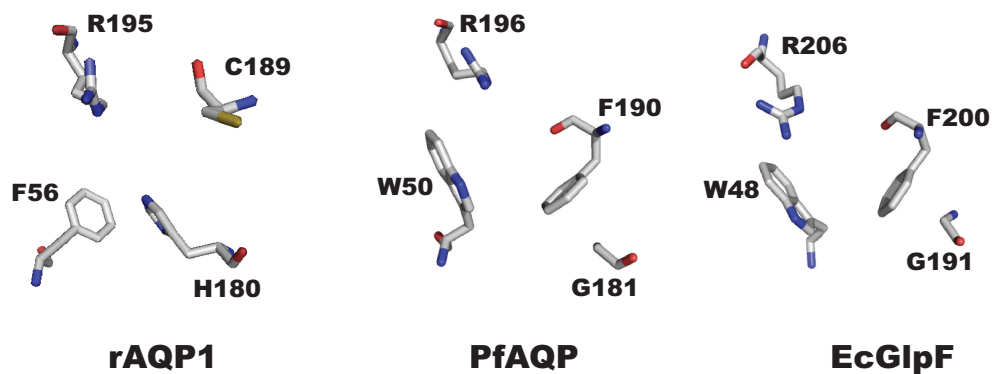


Abbildung 1.3: Darstellung der ar/R-Region vom typischen orthodoxen Aquaporin hAQP1 (nach PDB 1IH5), typischen Aquaglyceroporin EcGlpF (nach PDB 1FX8) und Aquaglyceroporin PfAQP (nach PDB 3C02). (Erstellung der Abbildung mit Pymol)

Neben dem Größenausschluss von Molekülen kann die ar/R-Region auch als ein Proton-Filter dienen. Die positiv geladene Seitenkette vom Arginin in dieser Region stellt auch eine energetische Barriere für die Protonen dar [19, 23].

1.3 Ungewöhnliche Aquaporine aus *Salinispora tropica* - mit Arsenatreduktase fusionierte Arsenit-leitende Aquaporine?

1.3.1 *Salinispora tropica* und dessen Aquaporine

Salinispora tropica, ein Meeresbakterium, gehört zur Familie der Micromonosporaceae, welche wiederum zur Ordnung der Actinomycetes gehört [31]. Wie auch andere Organismen aus dieser Ordnung weist *S. tropica* einen aktiven Sekundärstoffwechsel auf, besonders sind viele pharmakologisch aktive Metabolite, z. B. der Proteasome-Inhibitor Salinosporamid A [32], neuartige hoch oxygenierte Makrolide Sporolid A und B [33] bzw. Lymphostin [34] und Salinilactam [35]. Um das weitere biosynthetische Potential von *S. tropica* zu untersuchen, wurde das Genom (5 183 331 bp) von *S. tropica* CNB-440 entschlüsselt. Vier putative Aquaporin-Gene wurden bioinformatisch festgestellt. Ungewöhnlich ist es, dass zwei putative Aquaporin-Gene strop634 und strop1447 hinter ihrer normalen Aquaporin-Sequenz zusätzlich noch jeweils eine putative Arsenatreduktase-Sequenz beinhalten. Diese sich in einem offenen Leserahmen befindenden Aquaporin-Arsenatreduktase-Gene führen direkt zur Überlegung von deren Funktionszusammenhang bei Arsen-Detoxifikation.

1.3.2 Arsenatreduktasen, Aquaglyceroporine und Arsen-Detoxifikation

Allgemeine Arsen-Detoxifikation

Arsen ist ein weit in der Natur verbreitetes Element [36]. Alle Arsenverbindungen weisen eine hohe Zytotoxizität auf. Als anorganische Verbindungen liegt Arsen in vier Oxidationsstufen vor: Arsenhydrid(-III), Arsen(0), Arsenit(III) und Arsenat(V), wobei Arsenit und Arsenat die meisten in der Umwelt vorkommenden Formen sind. Die Toxizität von Arsenverbindungen ist abhängig von ihren Oxidationsstufen: Arsenhydrid(-III) > Arsenit(III) > Arsenat(V) > Arsen(0). Allerdings

1 Einleitung

wegen der geringen Mengen und der schlechten Stabilität spielt die Arsenhydrid-Vergiftung physiologisch keine große Rolle.

Die hohe Toxizität von Arsenit beruht auf seinen Wechselwirkungen mit Cystein-haltigen Enzymen wie Pyruvatdehydrogenase [37] oder Thioredoxinreduktase [38]. Das Arsenat ist ein Phosphat-Analogon [39] und kann statt Phosphat an vielen biochemischen Prozessen teilnehmen, z. B. bildet ein instabiles Arsenyl-ADP bei der ATP-Synthese [40].

Im Lauf der Evolution entwickelten alle lebenden Organismen verschiedene Arsen-Detoxifikationsmechanismen [41]. Der allgemeine Ablauf ist folgender (s. Abb. 1.4): Arsenverbindungen können entweder als Arsenat durch Phosphattransporter in die Zellen aufgenommen [42, 43] oder als Arsenit durch Aquaglyceroporine in die Zellen transportiert werden [44]. In den Zellen wird Arsenat durch zytosolische Arsenatreduktasen zu Arsenit reduziert [45]. Aufgrund der hohen Toxizität ist die unmittelbare Ausscheidung von Arsenit aus dem Zytosol erforderlich, dies erfolgt entweder durch Arsenittransporter in Form von freiem Arsenit z. B. ArsB bei *E. coli* und Acr3 bei *S. cerevisiae* [46] oder durch die Akkumulation in Vakuolen als konjugierte Form mit GSH bzw. anderen Thiolen mittels ABC-Transporter z. B. Ycf1 bei *S. cerevisiae* [47].

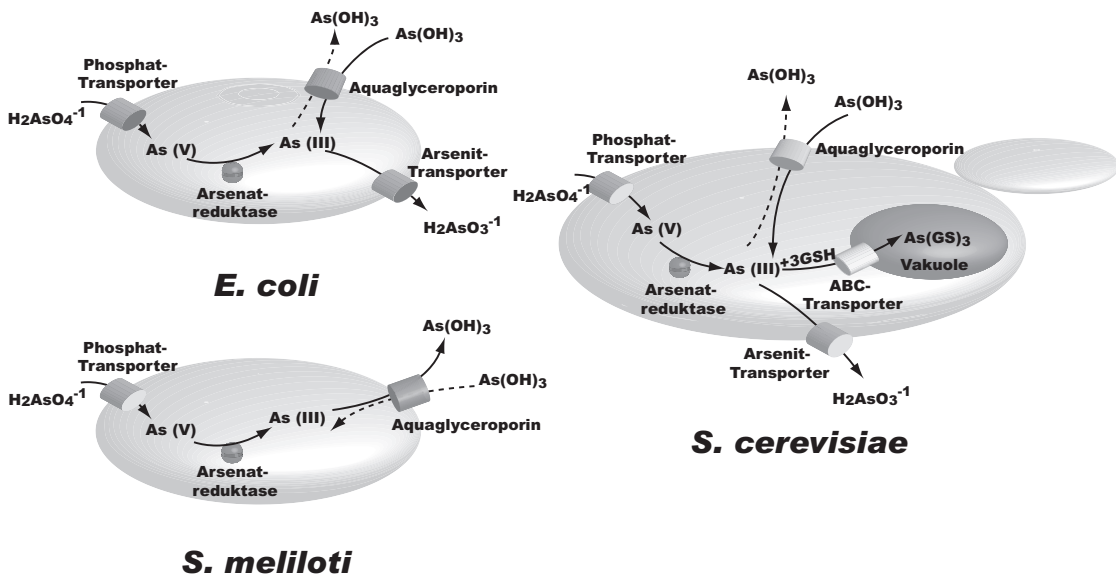


Abbildung 1.4: vereinfachte Darstellung der Mechanismen von Arsen-Detoxifikation in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *S. meliloti*. Weitere Details werden im Text erläutert.

In einigen Organismen z. B. *Sinorhizobium meliloti* fehlt das komplette Gen für Arsenittransporter, stattdessen benutzen sie ausschließlich ihr eigenes Aquaglyce-

roporin als die einzige Möglichkeit, um das toxische Arsenit auszuschcheiden (s. Abb. 1.4) [48].

Arsenatreduktase-Familie

Da unter aeroben Bedingungen Arsenat als meist vorkommende Arsenverbindung in der Natur vorliegt [49], ist der Arsenat-Detoxifikationsprozess besonders wichtig für die Organismen unter den Arsen-haltigen Bedingungen. Die Arsenatreduktase spielt dabei die Kernrolle bei der Arsenat-Detoxifikation. Bisher wurden vier nicht miteinander verbundene Arsenatreduktase-Familien entdeckt [50].

Arsenatreduktase aus dem gramnegativen Bakterium *E. coli* Die erste Familie der Arsenatreduktasen kommt vor allem in gramnegativen Bakterien vor, der typische Vertreter ist die bereits gut charakterisierte Arsenatreduktase EcArsC aus *E. coli*. In *E. coli* gibt es zwei Arsen-Resistenzsysteme (ars-Gensystem): ein chromsomales und ein Plasmid (R773) codiertes Resistenzsystem, auf dem jeweils ein *arsRBC*- und ein *arsRDABC*-Operon vorliegt [51]. Hier werden die Funktionen aller Gene im Operon kurz vorgestellt (s. Abb. 1.5).

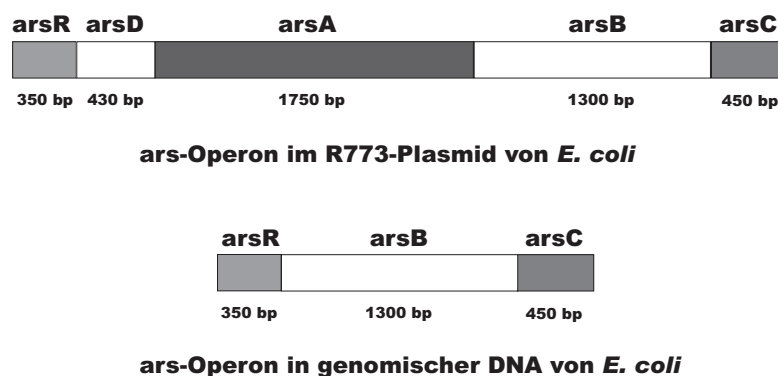


Abbildung 1.5: Abfolge der *ars*-Gene auf dem Operon in *E. coli*: *arsR* ist das Regulator-Gen, welches den Repressor codiert. Der Repressor dient als Controller für das Operon und ist in der Lage es abzuschalten. *arsD* codiert das ArsD-Protein, welches als ein Chaperon mit Arsenit bindet und die Bindungsaffinität von Arsenit zu ArsA erhöht. Damit steigt die Effizienz für die Arsenit-Ausscheidung [52]. *arsA* codiert das ArsA-Protein, eine Arsenit-ATPase. ArsA bildet gemeinsam mit ArsB eine Arsenitpumpe, welche Arsenit unter Verbrauch von ATP aus der Zelle transportiert [53]. Das ArsB-Protein, welches aus *arsB* codiert, ist ein integriertes Membranprotein, funktioniert als Pumpe für die Ausscheidung von Arsenit [54]. *arsC* codiert die Arsenatreduktase (ArsC).

1 Einleitung

Homologe Gene wurden auch bei anderen gramnegativen Bakterien in Chromosomen oder Plasmiden entdeckt [51]. Mittels der Kristallstruktur von EcArsC zusammen mit Substrat (Arsenat) und Produkt (Arsenit) wurde der Mechanismus für die EcArsC-vermittelte Arsenatreduktion aufgeklärt [55] (s. Abb. 1.6). Das einzige Cystein in EcArsC ist C12 und befindet sich im katalytischen Zentrum des Enzyms [56]. Während der Reduktion bindet es sich kovalent an Arsenat [55]. Anschließend wird eine Hydroxylgruppe von Arsenat mit GSH unter Abspaltung von Wasser substituiert [57]. Das Thiol-Transfer-Protein Glutaredoxin (Grx) als Reduktionsäquivalent ist essentiell für die Reduktion des Enzym-gebundenen Zwischenprodukts ES-As(V) zu ES-As(III) [57, 58]. Die Regeneration der oxidierten GrxS-SG erfolgt mit Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH/H⁺.

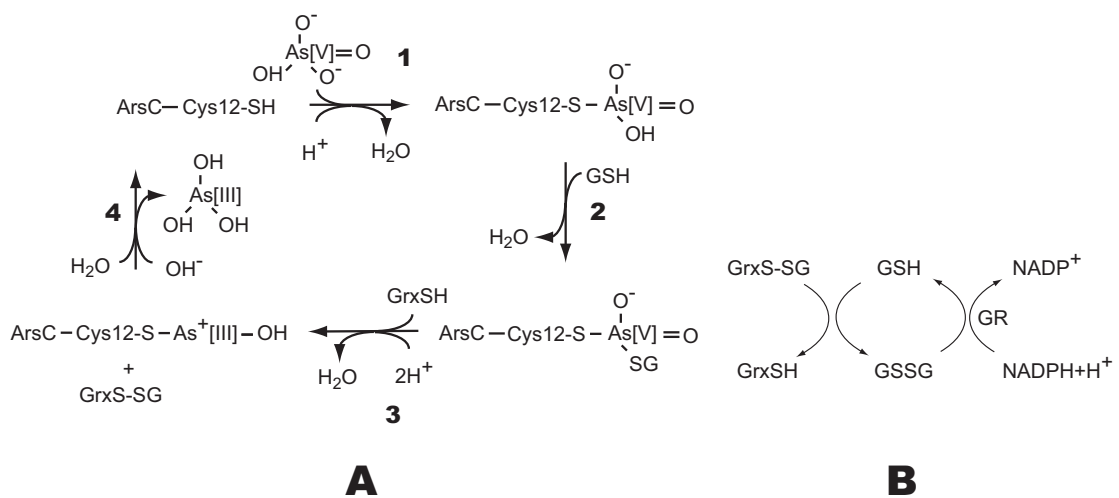


Abbildung 1.6: **A:** Reaktionsmechanismus von EcArsC aus *E. coli* Plasmid R773. 1. Schritt: Arsenat bindet sich kovalent an Cys12 der EcArsC, in Kristallstruktur ist ein As(V)-Komplex zu sehen. 2. Schritt: Der Komplex ist mit GSH gebunden. 3. Schritt: Arsenat wird unter Beteiligung von Grx zu Arsenit reduziert. 4. Schritt: Arsenit wird durch Hydrolyse freigesetzt. **B:** Regeneration des Reduktionsäquivalents GSH mit dem Glutathiol/Glutaredoxin/Glutathionreduktase-System unter Verbrauch von NADPH/H⁺.

Arsenatreduktase aus dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus*

Die zweite Familie von Arsenatreduktase stammt aus grampositiven Bakterien, z. B. *S. aureus* und *B. subtilis*. Die Arsenatreduktase aus *S. aureus* SaArsC, kodiert von arsC Gen in Plasmid pI258 wurde bereits charakterisiert [59]. Im Vergleich zu EcArsC hat SaArsC vier Cysteine in ihrer Proteinsequenz (C10, C15, C82, C89), wobei drei Cysteine (C10, C82, C89) sich im aktiven Zentrum befinden und

1.3 Ungewöhnliche Aquaporine aus *Salinispora tropica*

direkt an Arsenatreduktion beteiligt sind [60]. Ein anderes typisches Merkmal für diese Familie ist das Redoxintermediat, statt GSH/Grx/GR-System bei EcArsC ist Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (Trx/TrxR-System) für die Reduktion erforderlich (s. Abb. 1.7) [61]. Die Arsenatreduktasen dieser Familie haben eine ähnliche Proteinsequenz zur LMW-PTPase (*Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase*) und zeigen auch schwache Phosphatase-Aktivität [62].

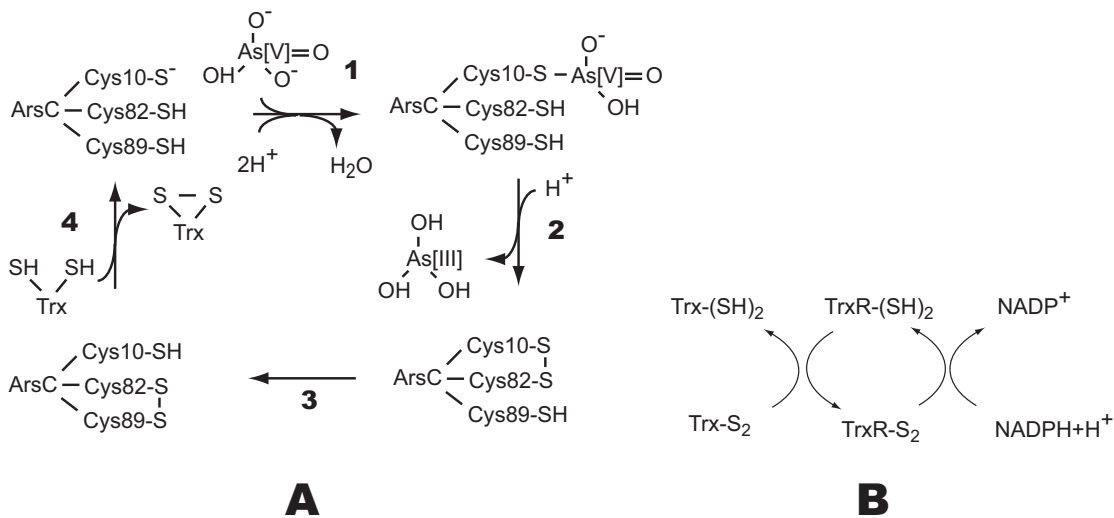


Abbildung 1.7: **A:** Reaktionsmechanismus von ScArsC aus *S. aureus*. 1. Schritt: Arsenat bindet sich kovalent an Cys10 der ScArsC. 2. Schritt: Arsenat wird zu Arsenit reduziert und gleichzeitig entsteht die oxidierte Form von ScArsC. Es bildet sich eine intermolekulare Disulfidbindung zwischen C10 und C82. 3. Schritt: eine Umlagerung von Disulfidbindung findet intermolekular statt. Es entsteht eine neue Disulfidbindung zwischen C82 und C89. 4. Schritt: Die oxidierte ScArsC wird unter der Übertragung von Disulfidbindung auf Thioredoxin (Trx) zur reduzierten Form umgewandelt. **B:** Regeneration des oxidierten Thioredoxins (Trx) mit Thioredoxinreduktase (TrxR) unter Verbrauch von NADPH/ H^+ .

Arsenatreduktase in Eukaryonten Die dritte Familie und einzige gut charakterisierte eukaryotische Arsenatreduktase ist Acr2 aus *S. cerevisiae* [63, 64]. Die Proteinsequenz von ScAcr2 ist ähnlich zur CDC25-Phosphatase (*human cell-cycle dual-specific phosphatase*). ScAcr2 hat zwar drei Cysteine (C76, C106, C119) in ihrer Proteinsequenz, lediglich ist C76 essenziell für die Enzymaktivität [65]. Wie auch bei anderen CDC25 Proteinen befindet sich C76 in einem HC76(X)₅R82-Motiv als das aktive Zentrum [66, 67]. Der Reaktionsmechanismus ähnelt dem von EcArsC [63] und das GSH/Grx/GR-System beteiligt sich ebenfalls am gesamten Reaktionszyklus.

1 Einleitung

Andere Arsenatreduktasen in Säugern sind bis jetzt noch nicht umfassend charakterisiert. Die Arsenatreduktase-Aktivität wurde jedoch bereits in menschlicher Leber entdeckt [68]. Es ist bisher noch nicht ganz klar, in welchen Familien sich die Arsenatreduktasen der Säuger eingliedern lassen.

Arsenatreduktase aus dem grampositiven Bakterium *Corynebacterium glutamicum* Die neu entdeckte Arsenatreduktase-Familie stammt ebenfalls aus einem grampositiven Bakterium *C. glutamicum*. Im Vergleich zu den Arsenatreduktasen aus den anderen grampositiven Bakterien besitzen zwei Arsenatreduktasen aus *C. glutamicum* CgArsC1 und CgArsC2 jeweils ein einziges Cystein in ihrer Proteinsequenz und das Cystein ist essenziell für die Arsenatreduktion [69]. Übrigens ist der Elektronentransfer für die Arsenatreduktion nicht wie üblich mit Trx/TrxR-System sondern mit Mycothiol/Mycoredoxin/Mycothionreduktase-System (Mrx/MSH/MR-System) gekoppelt. Das MSH/Mrx/MR-System ähnelt dem GSH/Grx/GR-System, es kommt aber ausschließlich in Actinobacteria vor [70]. Der Reaktionsmechanismus wurde analog zu dem von EcArsC postuliert (s. Abb. 1.8).

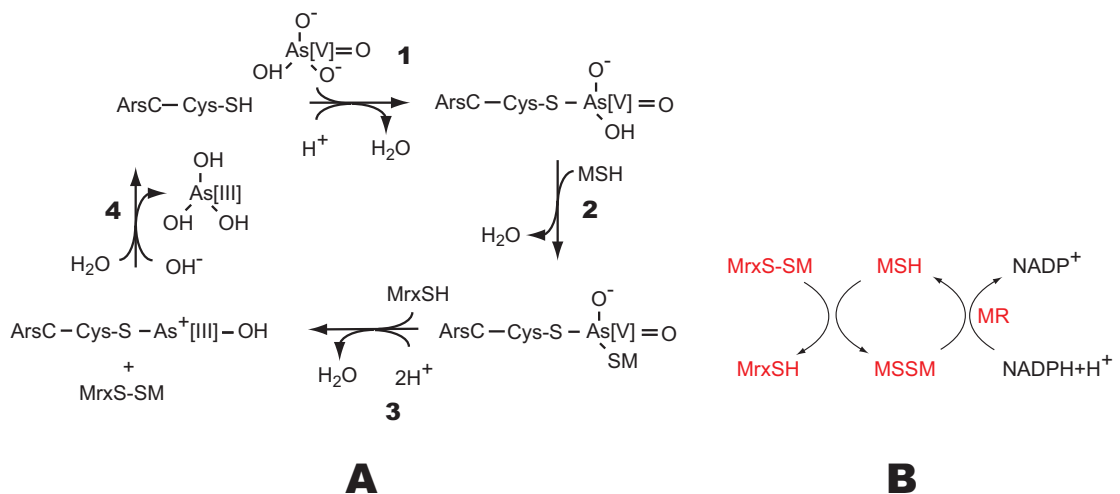


Abbildung 1.8: **A:** Reaktionsmechanismus von CgArsC1 und CgArsC2 aus *C. glutamicum*. Die Reduktionsschritte sind analog zu den von EcArsC aus *E. coli* Plasmid R773. Statt GSH, Grx und GR werden MSH, Mrx und MR sich an dem Reaktionszyklus beteiligt. **B:** Regeneration des Reduktionsäquivalents MSH mit MSH/Mrx/MR-System unter Verbrauch von NADPH/H⁺.

Aquaglyceroporine und Arsenit

Das trivalente Arsenit hat einen pK_a -Wert von 9,22. Unter physiologischen pH-Bedingungen liegt es vor allem als ungeladene Form $As(OH)_3$ vor, dessen strukturelle Form und Größe große Ähnlichkeit zum Glycerol aufweist (s. Abb. 1.9) [71]. Einige Aquaglyceroporine, z. B. EcGlpF aus *E. coli* [44], ScFps1 aus *S. cerevisiae* [72], AQP7 und AQP9 aus Säugern [73] zeigen bereits Arsenit-Leitfähigkeit. Daher spielen Aquaglyceroporine große Rolle sowohl bei der Arsenit-Toxifikation als auch bei der Arsenat-Detoxifikation in Organismen: einerseits leiten Aquaglyceroporine Arsenit(III) durch die Membranen in die Zelle bei einer Arsenit-haltigen Umgebung hinein und es führt zur Zytotoxizität, andererseits können die Aquaglyceroporine aber auch das durch Arsenatreduktase gebildete Arsenit(III) im Zytosol nach dem chemischen Gradienten aus den Zellen ausscheiden, was bei *S. meliloti* der Fall ist (s. Abb. 1.4).

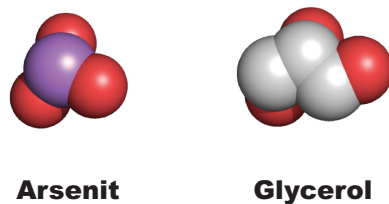


Abbildung 1.9: Größenvergleich eines Arsenit-Moleküls mit einem Glycerol-Molekül.
(Erstellung der Abbildung mit Pymol)

1.3.3 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund des Vorkommens von der Aquaporin-Domäne und Arsenatreduktase-Domäne in einem offenen Leserahmen im Genom von *S. tropica* wurde vermutet, dass sich die beiden Fusionsproteine direkt an der Arsenat-Detoxifikation beteiligen können. Nach der Klonierung sollen die Fusionsproteine und jeweiligen Domänen funktionell getestet und charakterisiert werden. Die Entstehung und Vorteile von diesen Fusionsproteinen dieser Art werden auch diskutiert.

1.4 Ungewöhnliche Aquaporine aus *Eimeria tenella* und *Toxoplasma gondii* - funktionelle Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine?

1.4.1 *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii* und deren Aquaporine

E. tenella und *T. gondii* sind pathogene einzellige Parasiten. *E. tenella* ist der Erreger für die Hühnervögel-Erkrankung Kokzidiose. Die Kokzidiose ist eine häufige parasitäre Erkrankung der Hühnervögel und jährlich verursacht 800 Millionen Dollar Schaden weltweit für die Landwirtschaft [74]. Das Genom von *E. tenella* mit ~ 60 Mbp wurde im Jahr 2007 komplett entschlüsselt. *T. gondii* ist ein bogenförmiger Parasit, der weltweit verbreitet ist. Beim Menschen kann dieser Parasit die Krankheit Toxoplasmose hervorrufen. Die Genomgröße von *T. gondii* wurde mit ~ 80 Mbp angegeben.

Die Membranproteine von solchen pathogenen Parasiten können als wichtige potenzielle Angriffspunkte für die Chemotherapeutika dienen [75], besonders sind die Aquaporine von solchen Parasiten, die an ihren verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt sind [76]. Das Proteinalignment zeigt, dass in beiden Genomen der Sporozoenparasiten *T. gondii* und *E. tenella* wenige Aquaporin-Gene vorhanden sind im Vergleich zu anderen Kinetoplasten.

Im Genom von *T. gondii* wurden bisher zwei Aquaporin-Gene entdeckt: TgAQP1 und TgAQP2. TgAQP1 weist eine mittelmäßige Wasser-Leitfähigkeit und hohe Glycerol-Leitfähigkeit auf [77]. TgAQP1 als ein Aquaglyceroporin ist in der PLV-Membran (*Plant-like Vacuole membran*) lokalisiert und durch den Ammoniak-Austausch kann für die Regulation vom zytosolischen pH-Wert verantwortlich sein [78]. Das zweite putative Aquaporin-Gen für TgAQP2 ist bislang noch nicht untersucht und charakterisiert.

Im Genom von *E. tenella* wurde bisher nur ein putatives Aquaporin-Gen für EtAQP1 berichtet [76]. Ein zweites putatives Aquaporin-Gen für EtAQP2 wurde in Rahmen dieser Arbeit identifiziert.

Die beiden putativen Aquaporine TgAQP2 und EtAQP2 sind ähnlich aufgebaut und weisen eine große Besonderheit auf, nämlich sie bestehen ungewöhnlicherweise aus zwei normalen Aquaporin-Genen in einem offenen Leserahmen. Damit können sozusagen Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine entstehen, welche bisher völlig unbekannt sind.

Die meisten bekannten Aquaporine sind Homotetramere und die Funktion der

1.4 Ungewöhnliche Aquaporine aus *Eimeria tenella* und *Toxoplasma gondii*

Zentralpore ist noch umstritten. Durch diese einzigartige natürliche Aquaporin-Aquaporin-Konstruktion können die beiden putativen Aquaporine als quasi Dimer in der Zellmembran vorgestellt werden, und deren Zentralpore besteht ebenfalls nicht mehr aus vier symmetrischen Außenwänden des Aquaporinmonomers, sondern aus zwei Symmetrischen Außenwänden (s. Abb. 1.10). Es ist hochinteressant, ob diese ungewöhnliche Konstruktion den beiden Aquaporinen neue Eigenschaften verleihen können.

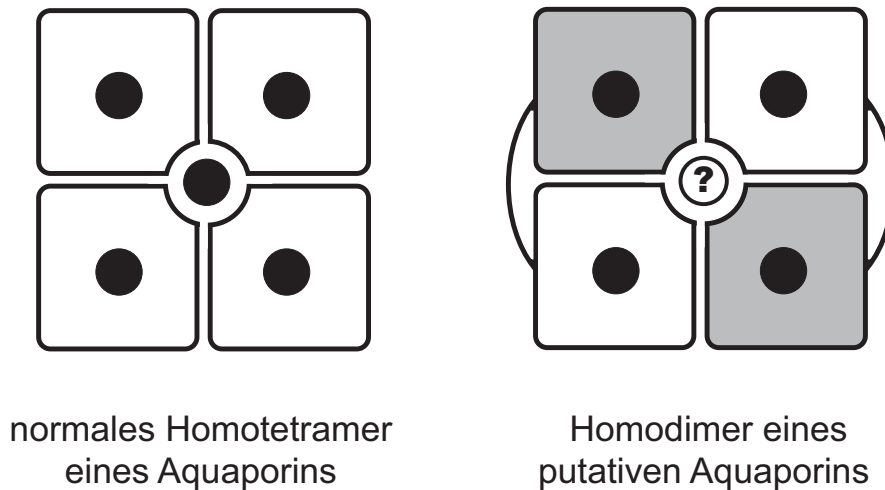


Abbildung 1.10: putative Konstruktion des Homodimers (Pseudotetramers) von TgAQP2 und EtAQP2 in Membranen (rechts) im Vergleich zu einem normalen Homotetramer eines Aquaporins (links)

1.4.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung und funktionelle Charakterisierung der beiden Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine TgAQP2 und EtAQP2 sowie die jeweiligen Aquaporin-Domänen, welche durch ihre Besonderheiten an Proteinsequenzen die neue Struktur-Funktionsbeziehung aufweisen könnten.

1.5 Ungewöhnliches Aquaglyceroporin PfAQP aus *Plasmodium falciparum* - ein wirklich gut Wasser-leitendes Aquaglyceroporin?

1.5.1 *Plasmodium falciparum* und dessen Aquaglyceroporin PfAQP

Die Malaria ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* ausgelöst. Die vier humanpathogenen Spezies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* können verschieden klinische Manifestationen verursachen, allerdings ist *P. falciparum*, der Erreger der Malaria tropica hauptsächlich für die Mortalität der Malaria verantwortlich.

Ein einziges Aquaporin-Gen wurde im Genom von *P. falciparum* entdeckt [79] und zum Teil charakterisiert [79, 80, 81, 82]. Allerdings wurden widersprüchliche Messdaten besonders über seine Wasser-Leitfähigkeit berichtet. Im Vergleich zu den anderen typischen Aquaglyceroporinen wie EcGlpF zeigte PfAQP in einigen Publikationen relative hohe Wasser-Leitfähigkeit [79, 81], obwohl die ar/R-Region von PfAQP und EcGlpF gleich aufgebaut (s. Abb. 1.3) und die Aminosäurereste auf der Kanalseite sehr ähnlich zugeordnet sind. Die Kristallstruktur von PfAQP [81] bestätigt die Vermutung, dass die Aminosäure E125 Wechselwirkung mit R196 hervorrufen können, und damit die Wasserstoffbrückenbindungen der Wasserkette an ar/R geändert werden können [30]. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine einzige Änderung von einer Wasserstoffbrückenbindung am Kanalbereich bei PfAQP die Wasser-Leitfähigkeit enorm beeinflussen kann.

In einer anderen Publikation wurde aber keine Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP bei einem Protoplasten-basierten Schwelltest gezeigt [82], obwohl die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP in einer anderen Forschungsgruppe mit dem ähnlichen Messprinzip bei einer Liposome-basierten Stopped-Flow-Messung positiv nachgewiesen wurde [81]. Dazu wurde die Diskussion ausgelöst, ob PfAQP wirklich ein gut Wasser-leitendes Aquaglyceroporin ist und warum die unterschiedlichen Messdaten bei den ähnlichen Testsystemen geliefert wurden.

Die Stopped-Flow-Messung als eine Standardmethode zur Charakterisierung der Wasser- und Solut-Leitfähigkeit durch die Aqua(glycero)porine ist in verschiedenen Forschungslabors etabliert [26, 83, 84]. Allerdings sind die Testbedingungen vor allem die eingesetzten Osmolyte bisher nicht einheitlich eingesetzt und damit sind die Messdaten auch nicht direkt vergleichbar. Ob solche unterschiedlichen Testbedingungen vor allem eingesetzte Osmolyte möglicherweise die Messung der

1.5 Ungewöhnliches Aquaglyceroporin PfAQP aus *Plasmodium falciparum*

zu untersuchenden Aqua(glycero)porine beeinflussen und damit die widersprüchlichen Messdaten verursachen können, ist bisher noch nicht untersucht.

1.5.2 Zielsetzung der Arbeit

Um PfAQP mit dem bekannten Aquaglyceroporin EcGlpF unter verschiedenen Bedingungen (Osmolyten) bei der Stopped-Flow-Messung direkt vergleichen zu können, wurden die beiden Aquaglyceroporine in Hefezellen exprimiert und zu Protoplasten präpariert. Deren Wasser- und Solut-Leitfähigkeit wurden in verschiedenen Osmolyten getestet, um die potenzielle Wechselwirkung von den Osmolyten auf die beiden Aquaglyceroporine zu untersuchen. Einerseits geht es um die Methodenentwicklung für die Stopped-Flow-Messung und die richtige Darstellung/Charakterisierung der Aqua(glycero)porine, andererseits kann die Struktur-Funktionsbeziehung der Aqua(glycero)porine z. B. PfAQP damit unter neuen Aspekten betrachtet werden.

1 Einleitung

2 Material

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen Sterilisationsautoklav

AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien Rapid Fixer G354 und Developer G153 for medical x-ray film processing

Applichem, Darmstadt Tween®20, L-Prolin, Glycin

Amersham Biosciences, GE Healthcare, Littel Chalfont Buckinghamshire, UK
Hyperfilm ECL, PVDF-Blotting-membran Hybond™-P, ECL Puls Western Blot Detektion System

Beckman Coulter, Krefeld Genome Lab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, Optima™ XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti, Beckman DU®-530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer

Becton Dickinson, Heidelberg Bacto™-Agar, Bacto™-Yeast Extract, Bacto™-Tryptone, Bacto™-Peptone, Difco™-Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

Biochrom, Berlin Penicillin, Streptomycin, BSA

Biogenes, Berlin Antikörperherstellung complete and easy

Bio-Rad, München Transblot® SD semidry transfer cell, Gene Pulser® II Electroporation System, Spannungsquelle für Elektrophorese Power-Pac 200, Bio-Rad Protein Assay

Boehringer Mannheim, Mannheim DTT

Clemens, Waldbüttelbronn Dualblock Primus advanced HT2X und Primus 25 mit HT Manager Software

Enzo Life Sciences, Lörrach Auranofin

Eppendorf, Hamburg BioPhotometer, Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R

2 Material

Fermentas, St. Leon-Rot Restriktionsendonukleasen, *Pfu*-polymerase, λ -DNA, T4-DNA Ligase

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK NHS HP SpinTrapTM

Genaxxon Bioscience, Biberach *Tag*-Polymerase (5 U/ μ l), Ampicillin-Natrium, TE-MED, SDS, dNTPs, 10 \times PCR-Puffer

Heraeus Instruments, Osterode Laborzentrifuge Multifuge 1S-R, Mikrozentrifuge Biofuge pico

Herolab, Wiesloch UV-Translluminator UVT-20 S/M

Infors, Bottmingen, Schweiz Brutschränke Infors

Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK Goat Anti-Mouse IgG

Jasco, Gross-Umstadt Stopped-Flow BioLogic: BioKine Ver 4.42, Küvette FC-08, Lichtbox mit 150W Xe(Hg)-Lampe, Mischeinheit SFM-300, Microprocessor Unit MPS-60, Modular UV/Vis-Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator BH-10-61UV, Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250

Kern & Sohn, Balingen Feinwaage ABS 120-4

LI-COR Biosciences, Bad Homburg LI-COR[®] DNA Sequencer 4200 mit Auswertungssystem

Macherey-Nagel, Düren Nucleotrap[®]

Merck, Darmstadt Ammoniumperoxodisulfat (APS), HCl, PEG 300

Mettler-Toledo, Gießen RAININ Classic[®] Pipetten

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich Ethidiumbromidtabletten, Zymolyase 20T

MWG-Biotech, Ebersberg Oligonukleotide (Primer)

National Diagnostics, Atlanta, USA Sequagel[®] XR, Sequagel[®] Complete Buffer Reagent

New England Bio Labs, Frankfurt am Main Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase, prestained Protein Marker

Panasonic, Osaka, Japan CCTV Camera WV-CD 20

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wellesley, USA Perkin-Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer 3030-B

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Peqlab, Erlangen SDS-PAGE-Kammer PerfectBlue® vertikales Dopplegelsystem
Twin S, peqGold Protein-Marker III prestained, peqGold Protein-Marker I
unstained

Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz Electrophoresis Power Supply-EPS 300

Promega, Madison, USA Wizard® Plus SV MiniPreps DNA Purification Kit

Qiagen, Hilden Ni-NTA-Agarose

Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Rapid DNA Ligation Kit, complete EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets, Lumi-Imager™ F1, Anti-HA (12CA5)

Roth, Karlsruhe Rotiphorese® Gel 40 (37,5 %), Rotiphorese® Blau R, Milchpulver, ATP, Na₂HPO₄, Glycerol, Glycin, KCl, MgCl₂, Methanol, NaCl, NaOH, Tris, Tween 20, Glucose, Sorbitol, EDTA, ZelluTrans Dialysiermembranen

Sarstedt, Nümbrecht Labor-Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Sterilfilter)

Savant Instruments, Farmingdale, USA DNA SpeedVac® 110 Vakuumzentrifuge

Schleicher & Schuell, Dassel Whatman Chromatography Paper 3MM

SCHOTT Instruments, Mainz Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Scientific-Industries, Bohemia, USA Vortex Genie 2

SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel Reinstwasseranlage

Sigma-Aldrich, München APS, Urea, DNA-Natriumsalz Typ II vom Lachssperma, Thioredoxin reductase from *E. coli*, Thioredoxin from *E. coli*

Stratagene, Heidelberg *PfuTurbo*® DNA-polymerase

Südlaborbedarf, Gauting High Yield® PCR Clean-up & Gel-Extraction Kit

Superior, Marienfeld Zählkammer Fuchs-Rosenthal Bright-line

Thermo Scientific, Schwerte SulfoLink® Immobilization Trial Kit, Hochdruck-Homogenisator French Press cell disrupter FA-078 mit French Press Zelle FA-032

WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen Heißluftsterilisator, Brutschrank

2.2 Plasmide

Die graphische Darstellung von Plasmiden erfolgte mit Programm PlasMapper Version 2.0.

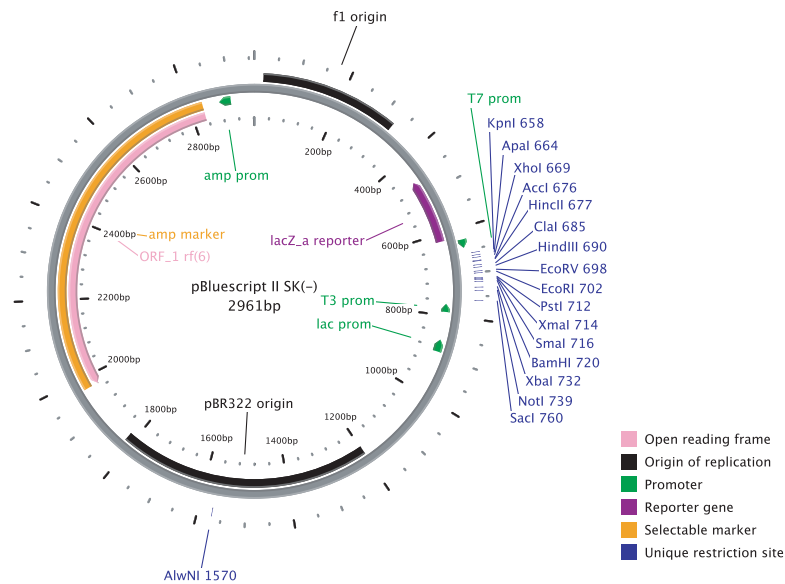


Abbildung 2.1: pBluescript II SK(-)

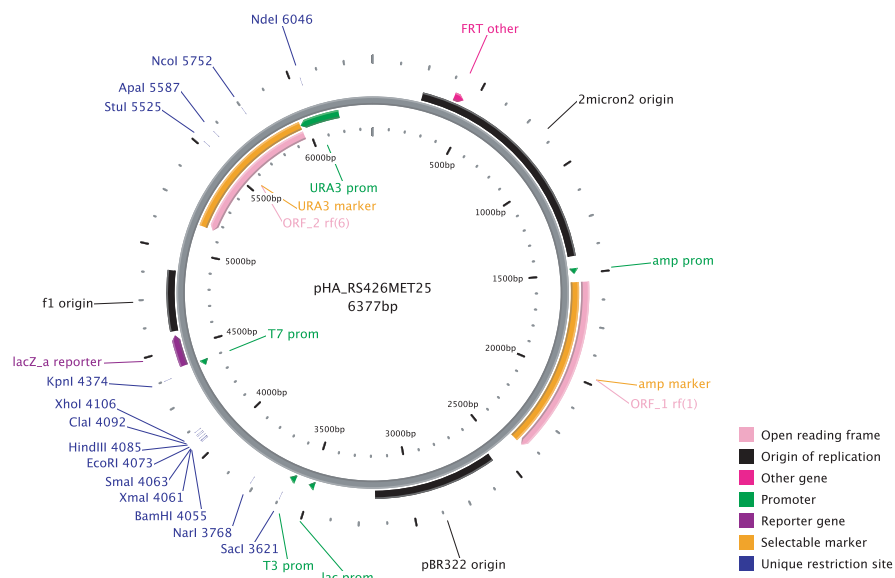


Abbildung 2.2: pHA_RS426MET25

2.2 Plasmide

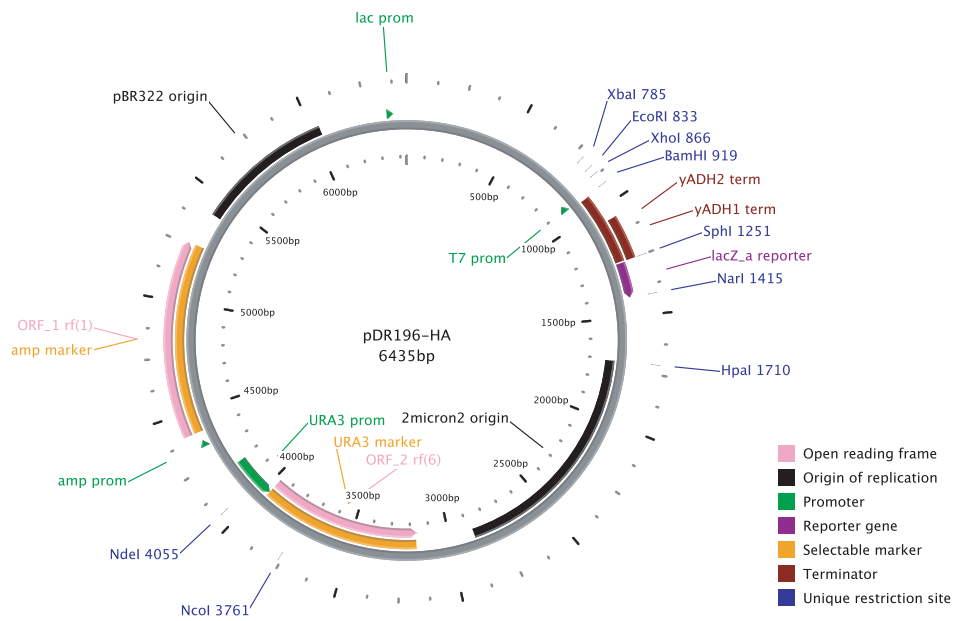


Abbildung 2.3: pDR196-HA

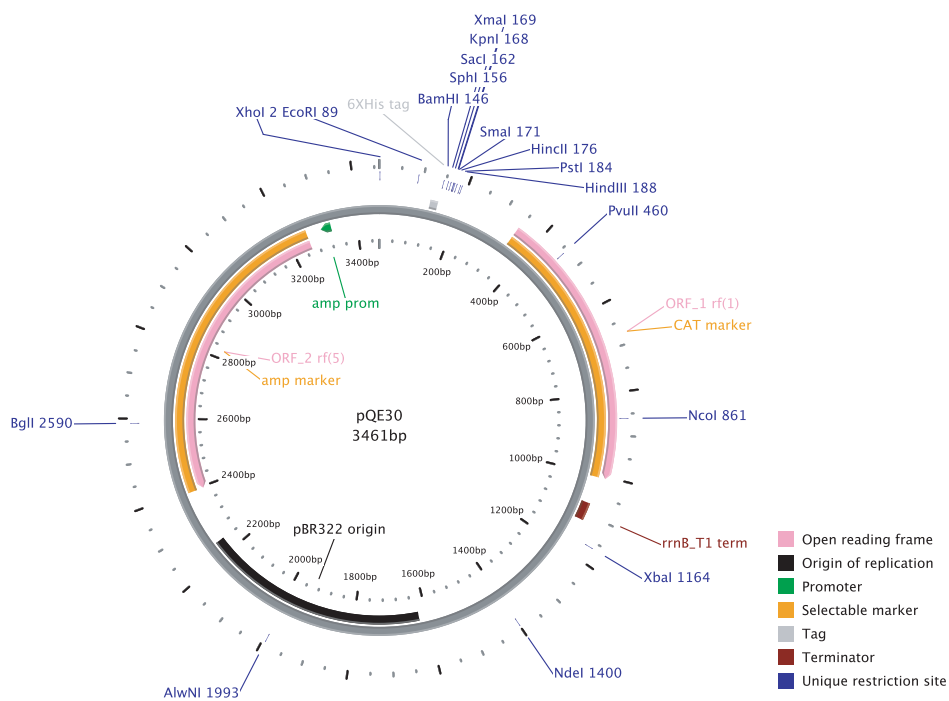


Abbildung 2.4: pQE30

2 Material

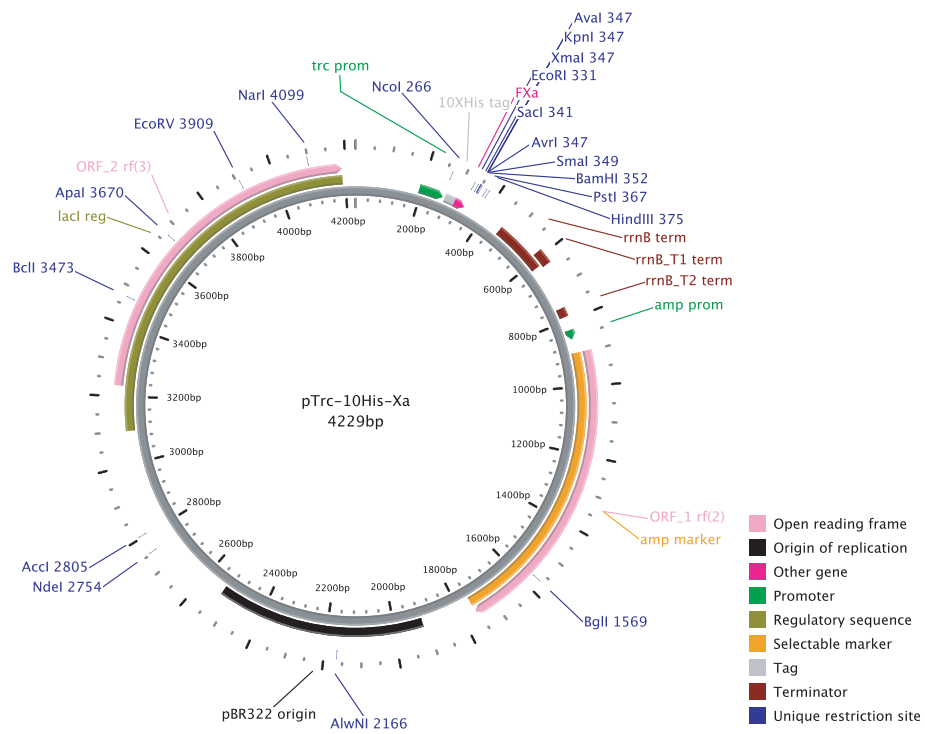


Abbildung 2.5: pTrc-10His-Xa

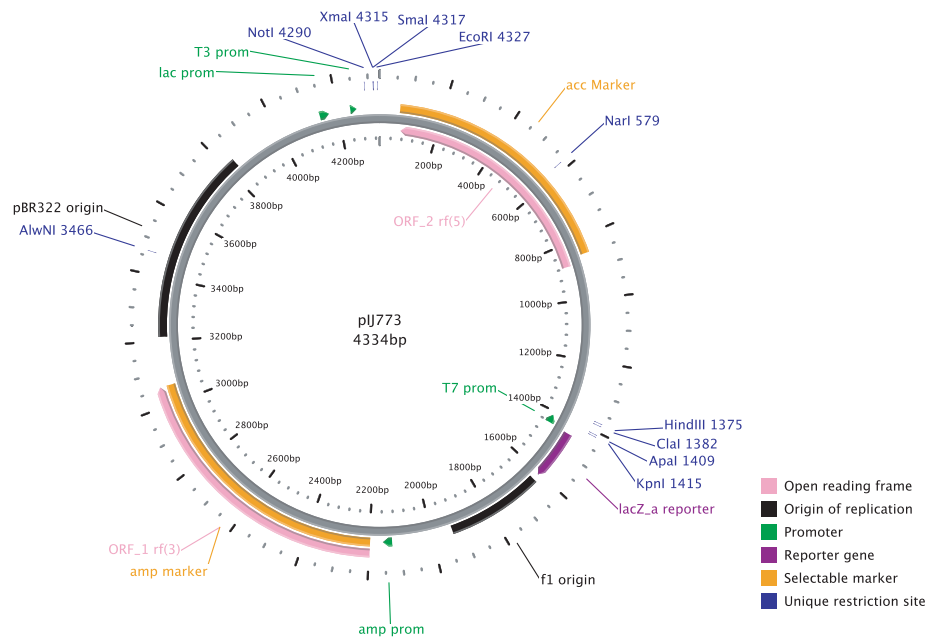


Abbildung 2.6: pIJ773

2.3 Oligonukleotide (Primer)

2.3.1 Sequenzierungsprimer

Die Sequenzierungsprimer sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
T7	s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript II SK(-)
T3	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	pBluescript II SK(-)
Met25	s	AGT AAA GCG TCT GTT AGA AAG G	pHA_RS426MET25
Cycl	as	GAC TTC AGA TCC AGG GAT A	pHA_RS426MET25

2.3.2 Klonierungsprimer

Die Schnittstellen sind fett gezeichnet.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
634-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TCC ATG GGA GAG AAC AGA CCG ATG AC	Strop634 (1)
634-r	as	TCA AAC GCC ATT GGT GCC GCC GGG CCG AGA TG	Strop634 (2)
634-AQPD-EcoRI-r	as	GAG AGA GAA TTC CAC GAG CCT TTC ATG CAG TGC GGA TTG	Strop634-AQP-D o. Stopcodon (3)
634-AQPD-XhoI-r	as	GAG AGA CTC GAG TCA CAC GAG CCT TTC ATG CAG TGC GGA TTG	Strop634-AQP-D m. Stopcodon (4)
634-ArsCD-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TTC ATG TCC GAC AAG CCC AGC GTC CTG TTC	Strop634-ArsC-D (5)
634-ArsCD-EcoRI-f	s	GAG AGA GAA TTC ATG TCC GAC AAG CCC AGC GTC CTG TTC	Strop634-ArsC-D (6)
1447-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TTC ATG GTG GGA TAC CAA GCG ATG AC	Strop1447 (7)
1447-r	as	TCA CGC GGT GGG GCG CAG CTC CGC GAT C	Strop1447 (8)
1447-AQPD-EcoRI-r1	as	GAG AGA GAA TTC CCC GAG GCG CTC CTC GTC GAT CTG	Strop61447-AQP-D o. Stopcodon (9)
1447-AQPD-EcoRI-r2	as	GAG AGA GAA TTC TCA CCC GAG GCG CTC CTC GTC GAT CTG	Strop1447-AQP-D m. Stopcodon (10)
1447-ArsCD-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TTC ATG GTC GAC AGG CCC ACT GTG TTG TTC	Strop1447-ArsC-D (11)
1447-ArsCD-EcoRI-f	s	GAG AGA GAA TTC GTC GAC AGG CCC ACT GTG TTG TTC	Strop1447-ArsC-D (12)
StTrx1-EcoRI-f	s	GAG AGA GAA TTC GTG GGA GCA ACC AAG TCG GTC ACT GAC	StTrx1 (13)

2 Material

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
StTrx1-BamHI-r	as	GAG AGA GGA TCC TCA GAG CGC GGA CTG GAT GAG CTT G	StTrx1 (14)
StTrx2-EcoRI-f	s	GAG AGA GAA TTC ATG GCA ACC GTT GAG CTG ACC ATG	StTrx2 (15)
StTrx2-BamHI-r	as	GAG AGA GGA TCC TCA GTT GGG GTG CTC GGC GAG CTT CTT G	StTrx2 (16)
StTrxR-XhoI-f	s	GAG AGA CTC GAG GTG GAT GAC GTC CGC AAC CTG ATC	StTrxR (17)
StTrxR-BamHI-r	as	GAG AGA GGA TCC TCA GCC CTG GAT GGT GGC GAT G	StTrxR (18)
EcoRI-XhoI-up	s	AATTCGGGC	EorRI-XhoI-Adapter (19)
EcoRI-XhoI-down	s	TCGAGCCCCG	EorRI-XhoI-Adapter (20)
EtAQP2-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TCC ATG AGT TCT CAG AAG CCG GCG TTG GCG GAG	EtAQP2 (21)
EtAQP2-HindIII-r	as	GAG AGA AAG CTT CTA GAG CCG CCT CCG GTA CTC CGA AGG CAT	EtAQP2 (22)
EtAQP2a-HindIII-r	as	GAG AGA AAG CTT CTA CTG CAG ACT CCG CTC CGA GGC CTT CTC CAG	EtAQP2a (23)
EtAQP2b-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TCC AAG GCC TCG GAG CGG AGT CTG CA	EtAQP2b (24)
EtAQP2-SacI-f	s	GAG AGA GAG CTC GGC GCG GGC CTC CTG GTG	EtAQP2 (25)
EtAQP2-SacI-r	as	GAG AGA GAG CTC CAG GTG ACC CCG GAA TAT G	EtAQP2 (26)
TgAQP2-BamHI-f	s	CT GGA TCC GAG ATG GCA GAC TTT GAC AAG	TgAQP2 (27)
TgAQP2-HindIII-r	as	TC AAG CTT AAC CAT TTG ACT TGA GTT TCG T	TgAQP2 (28)
TgAQP2a-XhoI-r	as	GAG AGA CTC GAG CGC GTG TCT CTG GTA CTG GCT G	TgAQP2a (29)
TgAQP2b-BamHI-f	s	GAG AGA GGA TCC AAG CTG GCG TAC GAC AAC CTG	TgAQP2b (30)

2.3.3 Primer zur Konstruktion und Verifizierung des *E. coli*-Knockouts

Die Schnittstellen sind fett gezeichnet.

<i>Name</i>	<i>Sinn</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
arsO5-NotI-f	s	GAG AGA GCG GCC GCA TGT TAA AGG GCT AAG AGT AGT GTG CTC	5'-Linkerarm

2.5 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Name	Sinn	Sequenz	Kurzbeschreibung
arsO5-EcoRI-r	as	GAG AGA GAA TTC TGA CAT ATT GCG CTC CTG ATT GTT GCA GGT AG	5'-Linkerarm
arsO3-HindIII-f	s	GAG AGA AAG CTT AAG CGG CGA TAT CCC CCC CAC AGG TTG TTA G	3'-Linkerarm
arsO3-KpnI-r	as	GAG AGA GGT ACC TTC AGC AAT AAA ATT AGT ATC TGA AAA CAT GG	3'-Linkerarm
arsO+1550-f	s	TGT GCG TTG GAT CGG AAG AGA AGA TTG TC	5'-Verifizierung
v1a-r	as	ACG ACG CTG CAT CTT GCC GAG TTG ATG GCA AAG GTT C	5'-Verifizierung
3a-f	s	TCA GCG TGA CAT CAT TCT GTG GGC CGT ACG CTG GTA C	3'-Verifizierung
arsO-1230-r	as	TTA AGT AGA TCT TCG AAA TAA AAC CTT G	3'-Verifizierung

2.4 Verwendete *E. coli*-Stämme

DH5 α	F ⁻ φ 80lacZ Δ 15M(lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 phoA supE44 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _K ⁺) λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> [85]
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> lac[F'proAB lacIqZ δ M15 Tn10(Tet ^r)] [86]
BL21(DE3)pRep4	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁺) <i>gal dcm</i> (DE3) pRep4 (Neo ^r)
SK46	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44</i> (AS) <i>rfbD1 spoT1 thi-1 aqpZ</i> Δ (Kan ^r) <i>glpF</i> Δ (Sm ^r) [87]
SK47	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44</i> (AS) <i>rfbD1 spoT1 thi-1 aqpZ</i> Δ (Kan ^r) <i>glpF</i> Δ (Sm ^r) <i>arsO</i> Δ (HPR ^r)

2.5 Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

BY4742	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i> von Euroscarf
BY4742 Δ fps1	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, fps1::KanMX4</i>
31019 Δ fps1	<i>MATα, ura3, mep1Δmep2Δ::LEU, mep3Δ::KanMX2; fps1Δ0</i>
CY162	<i>MATα, ura3-52, trk1Δ, his3Δ200, his4-15, trk2Δ1::pCK64</i>

2.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Methoden wurden steril-filtriert (0,2 µm Porenweite) bzw. autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min).

2.6.1 Puffer und Lösungen für Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TAE Puffer		Probenpuffer orange (10 ×)	
40 mM	Tris/Acetat, pH 8,0	0,4 %	Orange G
1 mM	EDTA	30 %	Glycerol
		100 mM	EDTA

Miniprep (ohne Kit)

P1-Puffer		P2-Puffer	
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0	200 mM	NaOH
10 mM	EDTA	1 %	SDS
P3-Puffer			
3 M	Kaliumacetat, pH 5,5		

Puffer für DNA-Isolierung

TE-Puffer		Phenol/Chloroform-Lösung (V/V)	
10 mM	Tris-HCl, pH 8,0	95 %	Phenol
1 mM	Na ₂ EDTA	4 %	Chloroform
		1 %	Isoamylalkohol
SDS-Lösung			
10 %	SDS		

2.6.2 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Die Festnährmedien (Agarplatten) werden in entsprechenden Flüssigmedien mit Zugabe von 15 g/l Agar hergestellt.

Bakterien-Nährmedien (ggf. mit Selektionsantibiotika)

LB-Medium				SYPD-Medium			
10 g/l	Trypton			4 g/l	Hefeextrakt		
10 g/l	NaCl			2 g/l	Pepton		
5 g/l	Hefeextrakt			3 g/l	Glucose		
				10 mM	Tris-HCl, pH 7,5		
				28 g/l	Seesalz		
Apr (1000 ×)							
50 mg/ml	Apramycin						
Amp (1000 ×)				Tet (1000 ×)			
100 mg/ml	Ampicillin	in	50%ig	15 mg/ml	Tetracyclin	in	50%ig
	Ethanol				Ethanol		

S. cerevisiae-Nährmedien

YPD-Medium				SD-Medium			
10 g/l	Hefeextrakt			1,7 g/l	YNB		
20 g/l	Pepton			5 g/l	Ammoniumsulfat		
20 g/l	Glucose			20 g/l	Glucose		
				mit NaOH auf pH 5,6			
SD HLK-Medium							
nach dem Autoklavieren zu SD-Medium							
hinzugeben:							
20 mg/l	L-Histidin						
20 mg/l	L-Leucin						
20 mg/l	L-Lysin						

Lösungen für Transformation von *E. coli*

LB (1,5 ×)				TSS-Lösung			
15 g/l	Trypton			15 ml	LB (1,5 ×)		
15 g/l	NaCl			4 ml	PEG (MW 3350) 50%		
7,5 g/l	Hefeextrakt			0,4 ml	1 M MgCl ₂		
10 mM	PIPES, pH 6,5			1 ml	DMSO		
CM-Lösung (10 ×)							
100 mM	CaCl ₂						
100 mM	MgCl ₂						

2 Material

Lösungen für Transformation von *S. cerevisiae*

Lithiumacetatlösung	PEG-Lösung
1 M Lithiumacetat	50 % PEG (MW3350)
<i>single stranded-carrier DNA</i> (2 mg/ml)	
200 mg in 100 ml TE-Puffer	

2.6.3 Puffer und Lösungen für Proteinchemie

Membranproteinpräparation aus *S. cerevisiae*

Extraktionspuffer	Lagerungspuffer
20 mM Tris-HCl, pH 8,0	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl ₂	100 mM KCl
1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM PMSF	1 mM PMSF
5 % Glycerol	10 % Glycerol

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer (4 ×)	Sammelgelpuffer (4 ×)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	500 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,4 % SDS	0,4 % SDS
Kathodenpuffer	SDS-Probenpuffer (4 ×)
25 mM Tris-HCl, pH 8,3	250 mM Tris-HCl, pH 6,8
192 mM Glycin	400 mM DTT
0,1 % SDS	0,02 % Bromphenolblau
	8 % SDS
Entfärbelösung	40 % Glycerol
10 % Essigsäure	
30 % Ethanol	

Western Blot

Transferpuffer (5 ×)
25 mM Tris-HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,0375 % SDS

Transferpuffer (1 ×)
10 ml Transferpuffer (5 ×)
10 ml Methanol
30 ml Aqua bidest.

TBS-Puffer (10 ×)
0,2 mM Tris-HCl, pH 7,6
1,35 mM NaCl

TBS-T-Puffer
100 ml/l TBS-Puffer (10 ×)
1 ml/l Tween 20

M-TBS-T-Puffer (10 ×)
3 % Milchpulver in TBS-T-Puffer

Protein-Affinitätschromatographie

Zelllysepuffer
12,5 mM Tris-HCl, pH 8,5
12,5 mM NaCl

Wasch- und Elutionspuffer
7,5-400 mM Imidazol in Zelllysepuffer

Protein-Dialyse

PBS-Puffer
10 mM Na_2HPO_4
2 mM KH_2PO_4
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
mit HCl auf pH 7,4

Tris-Dialysepuffer
50 mM Tris-HCl, pH 8,5
2 mM NaCl
2 mM MgCl_2

Protein-Fällung

TCA-Lösung (100 % (w/V))
500 mg Trichloressigsäure
350 µl Aqua bides.

2.6.4 Puffer und Lösungen für funktionelle Charakterisierung

S. cerevisiae-Wachstumsassay

Spurenelemente-Stammlösung (1000 ×)		Vitamin-Stammlösung (100 ×)	
160 µM	H ₃ BO ₃	0,3 mM	Thiamin-HCl
4 µM	CuSO ₄	0,4 mM	Calcium-D-Panthenat
13 µM	NaI	0,5 mM	Pyridoxin-HCl
16,5 µM	Na ₂ MoO ₄	0,6 µM	D-Biotin
49 µM	ZnSO ₄		
47,6 µM	Zitronensäure		
2,4 mM	MnSO ₄		
18,5 mM	FeCl ₃		

Protoplasten-Präparation und Stopped-Flow-Messung

Puffer I		Puffer II	
50 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,2	50 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,2
0,2 %	β-Mercaptoethanol	0,2 %	β-Mercaptoethanol
		1,8 M	Osmolyt
Puffer III		Puffer IV	
10 mM	Tris-HCl, pH 7,2	10 mM	Tris-HCl, pH 7,2
50 mM	NaCl	50 mM	NaCl
10 mM	CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂
1,2 M	Osmolyt	0,6-1,8 M	Osmolyt je nach Testbedingungen

Thioredoxinreduktase-Enzymassay

TrxR-Enzymtestpuffer (5 ×)		DTNB-Lösung (5 ×)	
250 mM	Tris-HCl	2 mM	DTNB
500 mM	NaCl		
2,5 mM	EDTA		

Arsenatreduktase-Enzymassay

ArsC-Enzymtestpuffer ($5 \times$)
100 mM Tris-HCl, pH 7,5
750 mM NaCl
2,5 mM EDTA

E. coli Trx-Lösung ($10 \times$)
67,2 μ M *E. coli* Thioredoxin

E. coli TrxR-Lösung ($10 \times$)
3,45 μ M *E. coli* Thioredoxinre-
duktase

Phosphotyrosinphosphatase-Enzymassay

PTPs-Enzymtestpuffer ($5 \times$)
100 mM Tris-HCl, pH 7,5
750 mM NaCl
2,5 mM EDTA

NPP-Lösung
400 μ M 4-Nitrophenylphosphat

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung der genomischen DNA aus *S. tropica*

Die Isolierung der genomischen DNA aus *S. tropica* erfolgte mittels der von Abed *et al.* beschriebenen Mikrowellen-Methode [88]. Zellen einer *S. tropica* Dauerkultur wurden in 100 ml SYPD-Medium überimpft und für 2 Tage bei 29°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation ($2\,500 \times g$, Raumtemperatur, 5 min) wurde das Bakterienpellet mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und noch einmal zentrifugiert ($13\,000 \times g$, Raumtemperatur, 5 min). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl TE-Puffer und 150 µl 10 % (w/V) SDS-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 65°C wurden die Zellen wieder abzentrifugiert ($13\,000 \times g$, Raumtemperatur, 5 min). Das Pellet wurde in einer Mikrowelle (600 W) 3-mal für jeweils 30 Sekunden erhitzt, wobei dazwischen das Pellet auf Raumtemperatur abkühlen gelassen wurde. Danach wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion, Ethanol Fällung und Zentrifugation ($13\,000 \times g$, 4°C, 30 min) wurde das DNA-Pellet noch 2-mal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in 40 µl Aqua bidest. mit Zugabe von 0,4 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) aufgelöst. Zur Entfernung der RNA wurde die DNA-Lösung bei 37°C für 3 h inkubiert. Danach wurde die fertige DNA-Lösung bei 4°C gelagert.

3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt. Für die Reaktion wurde die zu amplifizierende DNA als Template mit zwei sequenzspezifischen Primern (jeweils 0,5 µM), dNTPs (jeweils 200 µM), PCR-Puffer (mit 2 mM MgCl₂) und DNA-Polymerase (1 U *Taq* bzw. *Pfu*) versetzt und mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Das Temperaturprogramm (s. Tab. 3.1, 3.2) wurde an die verwendeten DNA-Template, die eingesetzten Primer und die Länge des PCR-Produktes angepasst.

Tabelle 3.1: Standard-PCR-Temperaturprogramm

Denaturierung	95°C	5 min
20-40 Zyklen		
Denaturierung	95°C	1 min
Primer-Anlagerung	T_m	30 s
Denaturierung	95°C	1 min
Extension	72°C	1-3 min
Auffüllung unfertiger Produkte	72°C	20 min
Kühlung der Produkte und Lagerung	4°C	∞

Tabelle 3.2: Touchdown-PCR-Temperaturprogramm

Denaturierung	95°C	5 min
10 Zyklen		
Denaturierung	95°C	1 min
Primer-Anlagerung	$T_m + 10^\circ\text{C}$, pro zwei Zyklen -2°C	30 s
Extension	72°C	1-3 min
20 Zyklen		
Denaturierung	95°C	1 min
Primer-Anlagerung	T_m	30 s
Extension	72°C	1-3 min
Auffüllung unfertiger Produkte	72°C	20 min
Kühlung der Produkte und Lagerung	4°C	∞

Die Anzahl der Zyklen war von der Güte der DNA-Quelle abhängig. Bei der Verwendung von Miniprep-DNA als Template wurden i.d.R. 30 Zyklen gefahren. Die Anlagerungstemperatur T_m in °C wurde näherungsweise mit der Formel (3.1) berechnet:

$$T_m = 4 \cdot (\text{GC}\%) + 2 \cdot (\text{AT}\%) \quad (3.1)$$

Dabei entsprechen GC% und AT% dem prozentualen GC- und AT-Gehalt im Primer. Falls die Anlagerungstemperaturen der beiden verwendeten Primer nach Berechnung unterschiedlich waren, wurde mit der niedriger errechneten Temperatur gearbeitet.

Die Extensionszeit t_{ex} in [s] ergab sich aus der Formel (3.2):

$$t_{ex} = 0,06 \cdot \text{Länge des erwarteten Produkts [bp]} \quad (3.2)$$

Sie betrug jedoch mindestens 1 min.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Je nach der zu erwartenden Bandengröße wurden 1-3 % (w/V) Agarose in TAE-Puffer (50 ml) suspendiert und in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 × Ladepuffer versetzt und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurden EcoRI/HindIII-verdaute bzw. PstI-verdaute λ-DNA verwendet (s. Abb. 3.1). Die DNA-Banden wurden bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm detektiert.

3.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden entweder mit dem Nucleotrap®-Kit oder mit dem High Yield® PCR Clean-up & Gel-Extraktion Kit entsprechend den Herstellungsangaben aus Agarosegelen extrahiert. Zur Elution wurden zwischen 15 und 50 µl Aqua bidest. eingesetzt.

Wenn eine Aufkonzentrierung von DNA erforderlich war, wurde diese mit der SpeedVac® durchgeführt.

3 Methoden

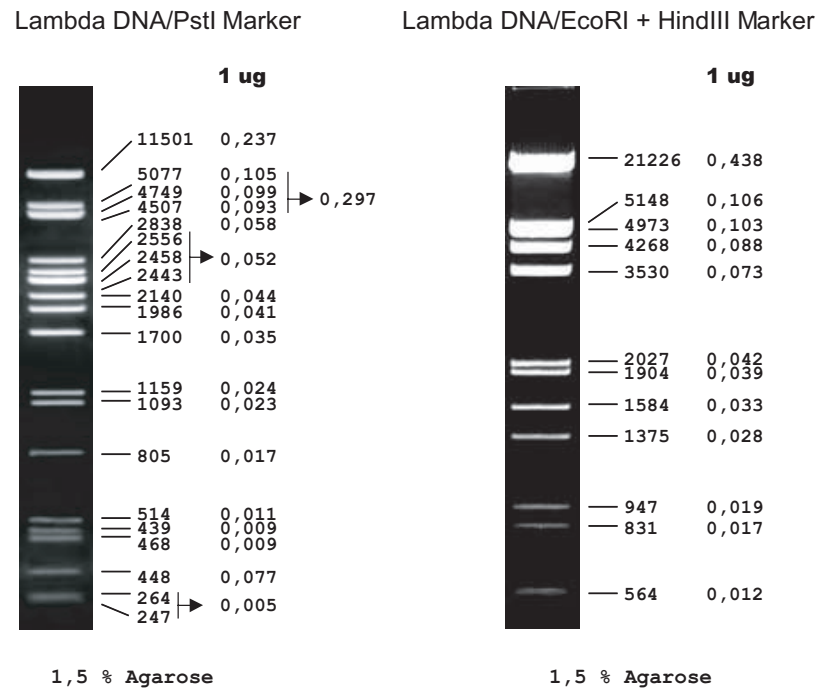


Abbildung 3.1: PstI verdaute und EcoRI/HindIII verdaute λ -DNA als DNA-Größenmarker

3.1.5 DNA-Aufreinigung

Mit den zwei soeben genannten Kit konnte auch die DNA z. B. PCR-Produkte oder mit Restriktionsenzymen verdaute DNA aufgereinigt werden. Die Durchführung war wiederum entsprechend den Herstellungsangaben.

3.1.6 Phenol/Chloroform Extraktion

Phenol/Chloroform Extraktion dient dazu, die Proteine (i. d. R. Enzyme, DNasen) von einer wässrigen DNA-Lösung abzutrennen. Zunächst wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (V/V/V: 50/49/1) ausgeschüttelt (ca. 1 min vortexen). Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei $13000 \times g$ für 1 min durchgeführt. Die Proteine befanden sich dann an der Phasengrenzschicht (weiße Haut). Die wässrige Oberphase wurde abpipettiert und 2-mal mit je $200 \mu\text{l}$ Chloroform/Isoamylalkohol (V/V: 24/1) ausgeschüttelt und zentrifugiert, um Phenolreste zu entfernen. Die obere wässrige Phase enthielt die von den Proteinen befreite DNA, die noch durch Ethanol-Fällung konzentriert werden musste.

3.1.7 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 ihres Volumens an Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4,5) und dem 2,5fachen des Volumens an eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz zur Ausbildung eines Niederschlags mindestens 30 min bei -20°C gehalten und anschließend bei 15 000 × g und 4°C 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und noch einmal bei 15 000 × g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entworfen. Nach Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 40 µl Aqua bidest. aufgenommen.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in Lösung wurden photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Die Konzentration von DNA konnte mit folgender Formel (3.3) in µg/µl berechnet werden:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260 \text{ nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung} \quad (3.3)$$

$f = 0,02$ bei Oligonukleotiden, Einzelstrang-DNA

$f = 0,04$ bei Plasmiden, Doppelstrang-DNA

Mit dem Verhältnis von $E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}}$ konnte zusätzlich die Qualität von DNA auch photometrisch geprüft werden. Wenn das Verhältnis über 1,8 lag, konnte man davon ausgehen, dass die DNA frei von Proteinen vorlag.

Konzentrationsbestimmung durch Agarosegel

Die Konzentration von DNA konnte durch einen Intensitätsvergleich mit DNA-Marker auf einem Agarosegel geschätzt werden. Insbesondere wurden die Konzentrationen von Vektor und Insert vor Ligationen durch diese Methode bestimmt.

3.1.9 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktionsverdau wurden üblicherweise 50-300 ng DNA in einem Volumen von 20-50 µl mit Restriktionsenzym(en) (1 U/µg DNA) in entsprechendem

3 Methoden

Puffer für ca. 1 h inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach den verwendeten Enzymen. Bei Verwendung von mehreren Enzymen im selben Ansatz wurde die Reaktion wenn möglich in einem für alle eingesetzten Enzyme kompatiblen Puffer angesetzt. Wenn die Inkompatibilität zu groß war, wurde ein zusätzlicher DNA-Aufreinigungsschritt zwischen beiden Verdauen durchgeführt.

3.1.10 5'-DNA-Phosphorylierung

Um die Ligationseffizienz zu erhöhen, konnten die PCR-Produkte zur Ligation in dephosphorylierte Vektoren am 5'-Ende phosphoryliert werden. Diese 5'-Phosphatreste wurden mit Hilfe der T4-Polynucleotidkinase eingeführt. 1-2 µg der gereinigten DNA wurden mit Kinase-Puffer, ATP (1 mM) und T4-Polynukleotidkinase (10 U) bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C 10 min inaktiviert.

3.1.11 5'-DNA-Dephosphorylierung

Die Religation eines geschnittenen Vektors mit glatten Enden konnte durch Dephosphorylierung der 5'-Enden verhindert werden. Dazu wurden 1-2 µg geschnittener Vektor mit 0,2 U alkalischer Phosphatase in Dephosphorylierungspuffer bei 37°C für 45 min inkubiert.

3.1.12 Ligation von DNA

Die Ligation von geschnittenen DNAs (Inserte und Vektoren) erfolgte unter Einsatz der T4 DNA Ligase im entsprechenden Puffer bei Raumtemperatur für 30 min oder bei 16°C über Nacht. Für eine effiziente Ligation wurde ein molares Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) in die Reaktion eingesetzt. Die gesamte Vektormenge betrug standardmäßig 30-100 ng.

3.1.13 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden DH5α-Stamm oder XL1-Blue-Stamm genommen. Bei der Herstellung von DH5α-Stamm-kompetenten Zellen wurde kein Selektionsantibiotikum eingesetzt, bei der Herstellung von XL1-Blue-Stamm-kompetenten Zellen wurde 15 µg/l Tetracyclin zum LB-Medium zugegeben. Beide *E. coli* Stämme eigneten sich für die Blau-Weiß-Selektion.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (PEG+DMSO Methode) [89]

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 100 ml LB-Medium inokuliert (1:100) und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreichte (ca. 2-3,5 h). Die Zellen wurden auf Eis für mindestens 10 min gehalten und danach bei 1 000 × g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und das Pellet wurde einmal mit 10 ml Eis vorgekühlter TSS-Lösung gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (1 000 × g, 4°C, 10 min) wurde das Pellet in 10 ml Eis-vorgekühlte TSS-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. 100 µl wurden Aliquots bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Calciumchlorid-Methode) [90]

Eine Bakterienkolonie wurde am Vormittag in 5 mL LB-Medium überführt und bei 37°C und 200 rpm unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wurden am Abend in 100 ml LB-Medium überführt und bei 20°C und 200 rpm über Nacht wachsen gelassen, bis am folgenden Tag eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht war. Die Zellen wurden zuerst auf Eis für 10 min inkubiert und bei 2 000 × g und 4°C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 30 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und wiederum 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2 000 × g, 4°C und 10 min wurde das Pellet in 10 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20 % Glycerol resuspendiert und für mindestens vier Stunden auf Eis gehalten. 100 µl Aliquots wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 in 200 ml LB überführt und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 weiterwachsen gelassen. Nach der Zentrifugation bei 2 000 × g, 4°C und 5 min wurde das Pellet dreimal mit jeweils 25 ml eiskaltem Aqua bidest. gewaschen. Nach der weiteren Zentrifugation (2 000 × g, 4°C und 5 min) wurde das Pellet in 1 ml eiskalter Glycerol-Lösung (10%ig) resuspendiert. 50 µl Aliquots wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

3.1.14 Transformation von *E. coli*-Zellen

Transformation von *E. coli* (Calciumchlorid-Methode)

Der Ligationsansatz oder das fertige Plasmid wurde mit 10 µl 10 × CM-Lösung gemischt und mit Aqua bidest. auf 100 µl aufgefüllt. Das Ganze wurde zu den gerade aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Nach der Inkubation auf Eis für 30 min wurde der Ansatz bei 42°C für 1 min und anschließend auf Eis für 2 min inkubiert. Es wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C für 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 13 000 × g für 1 min wurden 900 µl des Überstandes verworfen und der Rückstand in den verbliebenen 100 µl resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Transformation von *E. coli* (PEG+DMSO-Methode)

Der Ligationsansatz konnte direkt zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben werden. Die weitere Prozedur erfolgte entsprechend der CaCl₂-Methode.

Transformation von elektrokompententen *E. coli*-Zellen

Bei der Elektroporation wird ein kurzer elektrischer Impuls auf die Zellen angelegt, so dass die Permeabilität der Zellmembran verändert wird. Die DNA aus der Umgebung können dadurch in die Zellen aufgenommen werden.

Die elektrokompententen *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der DNA gemischt und in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten pipettiert. Vor der Elektroporation mussten die beiden Metallelektroden der Elektroporationsküvette gut abgetrocknet werden. Die Pulsdaten betrugen für *E. coli* 25 µF, 600 Ohm, 2,5 kV. Nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium in die Küvette zugegeben und die Zellen in ein steiles Eppi transferiert. Die Zellen wurden bei 37°C für 60 min unter Schütteln inkubiert. Das anschließende Vorgehen ist analog zu der CaCl₂-Methode.

3.1.15 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion diente zur Kontrolle der Klonierung des gewünschten DNA-Fragments (Insert) in den Vektor pBluescript II SK(-).

40 µl IPTG-Lösung (0,1 M) und 40 µl X-Gal-Lösung (2 %) wurden auf Agarplatten ausgestrichen, bevor die transformierten *E. coli* (XL1-Blue- oder DH5α-Zellen) darauf pipettiert und verteilt wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C sollten die rekombinanten Kolonien mit Insert weiß oder zum Teil hellblau und die ohne Insert blau erscheinen.

3.1.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Miniprep)

Einzelklone wurden in 6 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte gemäß der Vorschrift des verwendeten Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Die DNA wurde mit 40-45 µl Wasser eluiert und bei 4°C gelagert.

Alternativ dazu wurde Miniprep ohne Kit durchgeführt. Die Zellkultur wurde bei $13\,000 \times g$ 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zuerst in 150 µl P1-Puffer mit Zugabe von 2 µl DNase-freien RNase A (10 mg/ml) resuspendiert und auf Eis gehalten. Danach wurden 200 µl P2-Puffer zugegeben und durch 4-mal Umkehrung des Reaktionsgefäßes gemischt (nicht Vortexen). Innerhalb 5 min wurden 200 µl P3-Puffer dazu pipettiert und durch 2-mal Umkehrung des Gefäßes gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden die chromosomale DNA und andere Zellinhaltsstoffe durch 5 min Zentrifugation bei 4°C entfernt. Der Plasmid enthaltende Überstand wurde mit dem gleichen Volumen (550 µl) Isopropanol gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Das Ganze wurde nochmals 30 min bei $13\,000 \times g$ zentrifugiert. Das Plasmidpellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 70°C für 1 min getrocknet, um das überschüssige Ethanol zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde mit 40 µl Wasser aufgelöst und bei 4°C gelagert.

3.1.17 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierung mit LI-COR™ DNA Sequencer

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger mit dem Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit. Zu je 1,5 µl Reaktionsmix (G/A/C/T-Nukleotidmix) wurden 3 µl Mastermix, besteht aus 1-2 pmol Plasmid-DNA und 2-4 pmol fluoreszenzmarkierter Primer, pipettiert. Die Mischung wurden mit Mineralöl überschichtet und einem PCR-Programm (s. Tab. 3.3) unterzogen.

Nach der PCR-Reaktion wurden die Sequenzierungsansätze mit je 5 µl Formamid-Puffer versetzt und 0,5-1 µl davon auf ein Polyacrylamidgel (6 %) (s. Tab. 3.4) geladen.

3 Methoden

Tabelle 3.3: PCR-Programm für die Sequenzierung von DNA mit LI-COR™ DNA Sequencer

Denaturierung	95°C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	95°C	20 s
Primer-Anlagerung	T_m	20 s
Extension	70°C	20 s
Kühlung der Produkte und Lagerung	4°C	∞

Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des LI-COR™ DNA Sequencer 4200 bei 1500 V mit TBE als Laufpuffer. Die Auswertung wurde mit der BaseImagIR V.4.2 Software durchgeführt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Sequenziergels

30 ml	SequaGel® XR 7,5 %
7,5 ml	SequaGel® Complete Buffer Reagent
400 µl	DMSO
300 µl	10 % APS

DNA-Sequenzierung mit Beckman CEQ™ DNA Sequencer

Mit dem gleichen Prinzip wurde die Sequenzierung mit Beckman CEQ™ DNA Sequencer durchgeführt, wobei statt der fluoreszenzmarkierten Primer hier vier verschiedenen fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in dNTPs bei der PCR eingesetzt wurden. Zu jedem 10 µl PCR-Ansatz wurden 50-100 ng DNA, 1,6 pmol Primer und 4 µl DTCS (*Dye Terminator Cycle Sequencing*) Quick Start Master Mix pipettiert. Ein PCR-Programm (s. Tab. 3.5) wurde durchgeführt.

Der jeweilige fertige Sequenzierungsansatz wurde einem Aufreinigungsprozess mit Ethanol-Fällung unterzogen und das DNA-Pellet wurde in 40 µl im Kit beigelieferten Probe-Ladepuffer gelöst. Die Auftrennung und Detektion des Sequenzierungsansatzes erfolgte mit dem Kapillarsequenzierer CEQ™ 8000. Die Ergebnisse wurden mit der CEQ™ 8000 Genetic Analysis System Software ausgewertet.

Tabelle 3.5: PCR-Programm für die Sequenzierung von DNA mit Beckman CEQTM DNA Sequencer

30 Zyklen		
Denaturierung	96°C	20 s
Primer-Anlagerung	50°C	20 s
Kühlung der Produkte und Lagerung	4°C	∞

3.1.18 Transformation von *S. cerevisiae* (LiAc-Methode)

Der zu transformierende Hefestamm wurde in 5 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 29°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 ml YPD-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft, damit die OD₆₀₀ im frischen Medium 0,2 betrug. Das Medium wurde noch 3-5 Stunden bei 29°C im Schüttler (200 rpm) inkubiert bis die OD₆₀₀ zu ca. 0,6 erreichte. Die Hefezellen wurden bei 2 500 × g und 4°C für 5 min abzentrifugiert, das Pellet wurde zweimal mit Aqua bidest. gewaschen (1 × 25 ml, 1 × 1 ml) und anschließend in 1 ml Aqua bides. resuspendiert. 100 µl Zellsuspension für jede Transformation wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und nochmal zentrifugiert. Zum Hefezellpellet wurden dann 360 µl Transformationsmischung (240 µl PEG 3500 (50 %), 36 µl Lithiumacetat (1 M), 50 µl gekochte *single-stranded-carrier DNA*, 34 µl Wasser und 0,4 µl Plasmid-DNA) gegeben und das Ganze unter starkem Vortexen resuspendiert. Nach der Inkubation bei 42°C für 1 h wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (13 000 × g, 1 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und 100 µl davon auf eine SD HLK-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 3-5 d bei 29°C.

3.1.19 Dauerkultur von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur Lagerung von (transformierten) *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden Dauerkulturen angelegt.

Für *E. coli*: 1 ml *E. coli* Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (13 000 × g) und in 500 µl frischem LB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. 500 µl Glycerol-Lösung (80 %) wurden zugegeben und durch Vortexen gemischt. Die Zellen wurden sofort bei -80°C eingefroren.

Für *S. cerevisiae*: 500 µl *S. cerevisiae* Übernachtskultur wurden mit 500 µl Glycerol-Lösung (80 %) versetzt und sofort bei -80°C eingefroren.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Heterologe Expression der Proteine in *E. coli*

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurde die kodierende DNA zunächst in einem für *E. coli* (in dieser Arbeit: BL21(DE3)pRep4) geeigneten Expressionsvektor ligiert. Eine frisch transformierte *E. coli*-Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde diese Vorkultur 1:50 in einem frischen LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Für die Induktion wurde IPTG in der Endkonzentration von 100 µM zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 16°C über Nacht. Danach wurden die Zellen bei 4000 × g für 10 min geerntet, einmal mit Wasser gewaschen und noch einmal pelletiert. Das Zellpellet wurde bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert.

3.2.2 Aufschluss von Zellen mit French-Press

Der Aufschluss von Zellen erfolgte mit French-Press. Das gefrorene Zellpellet wurde in mindestens 20 ml Zellysepuffer (für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*) oder Membranextraktionspuffer (für Isolierung der Mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae* oder *S. tropica*) aufgetaut und resuspendiert. Bei ca. 1300 bar für *E. coli* bzw. ca. 1600 bar für *S. cerevisiae* und *S. tropica* wurden die resuspendierten Zellen in einer 40K Zelle in je 2 Durchgängen aufgeschlossen. Die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsaustritts aus der Druckzelle über das Auslaßventil sollte so geregelt sein, dass der Lysat tropfenweise austrat.

3.2.3 Aufreinigung der His-getaggten Proteine durch Metallionenaffinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Expressionsvektoren pQE30 und pTrec-10His-Xa enthalten Oligo-His-DNA-Sequenzen (mit 6 bzw. 10 Histidinen) in 5'-Richtung der MCS, damit waren die Expressionsprodukte an ihrem N-Terminus mit 6 bzw. 10 Histidinen getaggt. Es ist daher möglich, eine Affinitätsaufreinigung der Expressionsprodukte über Ni²⁺-NTA-Agarose durchzuführen.

Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an das Handbuch „The QIAexpressionist™“ (Fifth Edition, June 2003). Das durch Aufschluss erhaltene Zelllysate wurde mit Ni²⁺-NTA-Agarose (1 ml/1 Expressionskultur) versetzt und über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag wurde die mit His-getaggten Proteinen gebundene Ni²⁺-NTA-Agarose-Matrix als Säulenmaterial auf eine Säule mit Filterfritte gegeben. Die Säule wurde mit Imidazol-haltigen Wasch- und Elutionspuffern (7,5-400 mM Imidazol) gewaschen und das getaggte Protein wurde daraus eluiert. Alle eluierten Fraktionen wurden gesammelt und vor der weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Die Mengen und Reinheit an Proteinen in jeweiligen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Die Fraktion mit hohem Proteingehalt sowie hoher Reinheit wurde zur weiteren Verarbeitung ausgewählt.

3.2.4 Dialyse

Für die Umpufferung oder Entfernung der Komponenten mit kleiner Molekülmasse z. B. Imidazol in Proteinlösung wurde eine Dialyse durchgeführt. 1-2 ml Proteinlösung wurden in einen Dialyseschlauch (MWCO 8 000-10 000) gefüllt, die beiden Ende des Schlauchs wurden mit zwei Klammer verschlossen und das Ganze bei 4°C unter Rühren mehrfach gegen entsprechenden Dialysepuffer dialysiert.

3.2.5 TCA-Fällung

Um die Proteinlösung aufzukonzentrieren oder einige lösliche Bestandteile aus der Proteinlösung zu entfernen wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Die Proteinhaltige Lösung wurde im Volumenverhältnis 4:1 mit TCA-Lösung (100 % (w/V)) vermischt und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden zentrifugiert (13 000 × g, 4°C, 5 min) und das Pellet wurde dreimal mit ca. 200 µl eiskalte Aceton gewaschen und bei 95°C für 5-10 min getrocknet. Das Pellet wurde mit anschließend in entsprechendem Lagerungspuffer aufgenommen.

3.2.6 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Eine Kolonie der transformierten Hefezellen aus der Agarplatte wurde in 100 ml Medium angeimpft und 1-2 Tage bei 29°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,3 erreicht wurde. Nach der Zentrifugation (2 500 × g, 4°C, 5 min) wurden die Hefezellen einmal mit 50 ml eiskaltem Wasser und einmal

3 Methoden

mit 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Hefezellen in 0,5 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von ca. 0,5 g Säure-gewaschenen Glasperlen und 15 μ l Protease-Inhibitor-Mix (25 \times) wurden die Zellen zehnmal für 30 s durch Vortexen aufgeschlossen, wobei zwischen jedem Vortexschritt die Probe für 1 min auf Eis gekühlt werden sollte. Im Anschluss wurde die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (13 000 \times g, 4°C, 5 min) und der Membranprotein-haltige Überstand in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Zu den Zellrückständen und den Glasperlen wurden erneut 0,5 ml Extraktionspuffer und 15 μ l Protease-Inhibitor (25 \times) gegeben und durch Vortexen gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (13 000 \times g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand in dasselbe Ultrazentrifugenröhrchen vereinigt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 100 000 \times g, 4°C und unter Vakuum für 45 min. Der Überstand wurde entfernt und die mikrosomalen Fraktion im Pellet wurde in 100 μ l Lagerungspuffer mit Zugaben von 10 μ l Protease-Inhibitor-Mix (25 \times) resuspendiert. Die Probe wurde bei -20°C gelagert.

Für einen großen Ansatz von *S. cerevisiae* wurde der Zellaufschluss mit der French-Press durchgeführt.

3.2.7 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. tropica*

Eine Kolonie der *S. tropica* aus der SYPD-Agarplatte wurde in 100 ml SYPD-Medium angeimpft und 2-3 Tage bei 29°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (2 500 \times g, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde einmal mit 25 ml Aqua. bidest. gewaschen und anschließend in 20 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der French-Press aufgeschlossen. Der Lysat wurde zentrifugiert (2 500 \times g, 4°C, 5 min) und der Membranproteinhaltige Überstand wurde in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (100 000 \times g, 4°C, 45 min). Das Pellet wurde in Lagerungspuffer resuspendiert und die Membranproteine wurden mittels TCA-Fällung noch einmal aufgereinigt.

3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford-Methode mit Bio-Rad Protein Assay-Reagenz gemäß Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurde 1-20 μ l Proteinprobe (je nach der Proteinkonzentration) mit Wasser auf 800 μ l verdünnt und mit 200 μ l Reagenz versetzt. Nach kurzem Vortexen und Inkubation für 5 min wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Kalibriergerade wurde mit einer Verdünnungsreihe aus BSA-Lösung erstellt.

3.2.9 SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Je nachdem, in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen, können Gele mit unterschiedlicher Konzentration an Acrylamid verwendet werden. In dieser Arbeit wurden standardmäßig 4%ige Sammelgele und 12,5%ige Trenngele (s. Tab. 3.6) hergestellt und eingesetzt. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Minigele.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung von SDS-Acrylamidgelen

	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	5 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	3 ml	
Sammelgelpuffer		1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4 ml	0,6 ml
10 % APS	80 µl	25 µl
TEMED	50 µl	15 µl

Die Proteinproben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer (4 ×) gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Auf das SDS-Acrylamidgel wurden 20-40 µg Gesamtproteine pro Spur aufgetragen. Als Größenstandard dienten peqGOLD Protein-Marker I unstained oder peqGOLD Protein-Marker III prestained. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA pro Gel (ca. 90 min).

Die Gele konnten mittels Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (Rotiphoese® Blau R) für 1 h angefärbt oder für den weiteren Western Blot verwendet werden. Die Entfärbung erfolgte mit mehrmaligem leichtem Schwenken in Entfärbelösung, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.2.10 Immundetektion

Die Immundetektion eignet sich, Proteine spezifisch unter Verwendung spezieller Antikörper nachzuweisen.

Western Blot

Hier wurden die Proteine zuerst mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt, anschließend wurden sie elektrophoretisch auf eine Membran (PVDF) übertragen. Hierzu wurde die Methode des Semi-Dry-Elektrotransfers verwendet. Die

3 Methoden

PVDF-Membran und sechs Whatmanpapiere wurden auf die Größe des SDS-Polyacrylamidgels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 5 min in Methanol aktiviert und zusammen mit sechs Whatmanpapiere in Transferpuffer getränkt. Auf der Anodenplatte wurden zuerst drei getränkte Whatmanpapier übereinandergelegt, darauf folgten die PVDF-Membran und das SDS-Polyacrylamidgel. Die eventuell entstandenen Luftblasen wurden vorsichtig entfernt und die restlichen getränkten Whatmanpapiere wurden darauf gelegt. Der Transfer erfolgt bei einer konstanten Spannung von 10 V für 60 min.

Für die anschließende Immundetektion wurde die mit Proteinen beladene PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in M-TBS-T-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen zu beladen und somit eine unspezifische Anlagerung des Primärantikörpers zu verhindern. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2-3 h oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils 15 min wurde die PVDF-Membran mit einem Sekundärantikörper für 1-2 h inkubiert. Es folgte erneut dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer.

Im Anschluss wurde die Detektion als Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL plus Western Blotting Detektion System nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die auftretende Lumineszenz wurde durch Belichtung von Hyperfilm ECL oder bei Lumi Imager detektiert.

Dot Blot

Dot Blot ist eine methodische Vereinfachung des Western Blots. Im Vergleich zum Western Blot werden die Proteinproben nicht zuerst auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, sondern direkt auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Nach ca. 30 min Trocknung bei Raumtemperatur wurde analog zum Western Blot verfahren. Dot Blot dient als schneller Test auf die Immunreaktivität von Antikörperseren oder gereinigten Antikörpern gegen die Antigene.

3.2.11 Herstellung der Antikörperseren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung der Antikörperseren gegen zwei Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 aus *S. tropica* von der Firma Biogenes durchgeführt. Die beiden heterolog exprimierten und aufgereinigten Domänen wurden nach dem internen Herstellungsprotokoll jeweils in zwei Kaninchen injiziert, um die Immunreaktion und Bildung von polyklonalen Antikörpern auszulösen. Es folgte eine weitere fünfmalige Boosterinjektion über einen

Zeitraum von drei Monaten. Zu bestimmten Zeitpunkten (1 (Präimmunserum), sowie nach 35, 63 und 91 Tagen) wurde das Blut entnommen (20-50 ml). Die vier angefertigten Antikörperseren pro Kaninchen (insgesamt 16) wurden geliefert.

3.2.12 Aufreinigung der Antikörperseren durch Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Antikörperseren erfolgte durch das SulfoLink® Immobilization Trail Kit der Firma Thermo Scientific und NHS HP SpinTrap™ der Firma GE Healthcare.

Prinzip von Aufreinigung der Antikörperseren: Das Protein, das selber auch zur Immunisierung der Tiere und Gewinnung der Antikörperseren eingesetzt wird, wird als stationäre Phase an der Affinitätschromatographiesäule immobilisiert. Die Antikörper in Seren binden daher spezifisch an die stationäre Phase und anschließend werden die aufgereinigten Antikörper eluiert.

Aufreinigung der Antikörperseren mit SulfoLink® Immobilization Trail Kit

Bei Immobilisierung vom Antigen an das SulfoLink®-Agarose-Säulematerial wird eine kovalente Thioetherbindung zwischen der Jodoacetylgruppe des Säulenmaterials und dem Sulfhydrylgruppe des Cysteins in Proteinen gebildet (s. Abb. 3.2).

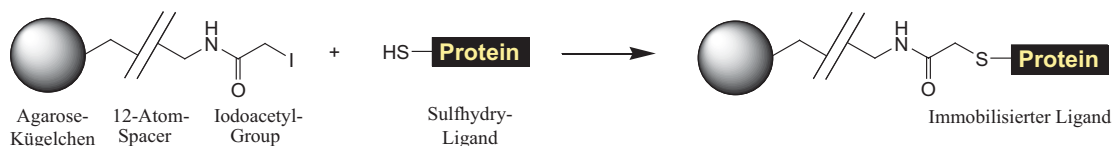


Abbildung 3.2: Struktur und Prinzip der Kopplungsreaktion des SulfoLink®-Agarose-Säulematerials. (Abbildung übernommen aus dem Thermo Scientific Protokoll)

Vorbereitung der Proteinlösung zur Immobilisierung 1 ml Proteinlösung mit der Konzentration von ca. 1 mg/ml wurde zuerst mit 50 mM 2-Mercaptoethanolamin (2-MEA) bei 37°C für 2 h inkubiert, damit alle Cysteine in reduzierter Form in den Proteinen vorlagen. Die reduzierte Proteinlösung wurde nach Herstellervorschrift entsalzt und mit Kopplungspuffer äquilibriert.

3 Methoden

Vorbereitung der Säule Die Säule wurde zuerst mit Kopplungspuffer gewaschen und schließlich in 2 ml Kopplungspuffer äquilibriert. Die vorbereitete Proteinlösung wurde in die Säule zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation ohne Schütteln bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurde die Säule mit Kopplungspuffer gewaschen und zur Absättigung der freien Bindungsstellen mit 5 ml 50 mM L-Cystein-Lösung für 15 min unter Schütteln inkubiert. Nach dem Spülen mit 15 ml NaN_3 -Lagerungspuffer wurde die Säule bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Bindung des Antikörpers an die Säule 2 ml Antikörperserum wurden auf die vorbereitete Säule gegeben und 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Durch die Zentrifugation ($1\,000 \times g$, 1 min) und das anschließend mehrmalige Waschen mit Waschpuffer wurden alle nicht gebundenen Serumproteine entfernt. Zur Überprüfung des Restproteingehalts wurde die Absorption des Durchlaufs bei 280 nm verfolgt.

Elution des Antikörpers Die Elution erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer (0,1-0,2 M Glycin-HCl pH 2,5-3,0). Der Durchlauf wurde in Eppendorfgefäß gesammelt, das vorher mit 100 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,5-9,0) gefüllt war. Die Elution wurde dreimal durchgeführt und die Antikörperkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Fraktion mit hoher Proteinkonzentration wurde mit PBS-Puffer dialysiert. Zur Aufkonzentrierung wurde der mit Antikörperlösung gefüllte Dialyseschlauch in Polyethylenglykol Pulver (PEG 6000) eingelegt und die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde noch einmal mit PBS-Puffer dialysiert.

Die Antikörperlösung wurde mit Glycerol-Lösung (80 %) 1:1 versetzt und bei -20°C gelagert.

Aufreinigung der Antikörperseren mit NHS HP SpinTrap™

Mit NHS HP SpinTrap™ wird die primäre Aminogruppe auf N-Terminus des Antigens an NHS-aktivierte Agarose-Matrix kovalent gebunden. Das Zielprotein (Antikörper) wird durch diese damit hergestellte Affinitätssäule aufgereinigt.

Vorbereitung der Proteinlösung zur Immobilisierung Die Proteinlösung wurde in PBS-Puffer umgepuffert, um Tris aus der originalen Proteinlösung zu entfernen.

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

Vorbereitung der Säule 200 µl Gel-Matrix-Suspension wurden in die SpinTrap-Säule gegeben. Nach der Entfernung des Lagerungspuffers durch Zentrifugation ($150 \times g$, 1 min) wurde die Säule dreimal mit 400 µl eiskaltem HCl (1 mM) gewaschen, und zentrifugiert ($150 \times g$, 1 min). Zur Immobilisierung wurden 200 µl vorbereitete Proteinlösung (Antigenlösung (0,5-1 mg/ml)) in die Säule zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht gebundenen Proteine durch Zentrifugation ($150 \times g$, 1 min) entfernt. Die freien Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit Blockpuffer (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0) und Waschpuffer (50 mM Glycin, 1 M NaCl, pH 3,0) nach dem Herstellerprotokoll abgesättigt. Zur Equilibrierung wurde die Säule dreimal mit 400 µl Bindungspuffer (TBS) gewaschen. Anschließend wurde die Säule in TBS-Puffer (200 µl) bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Bindung des Antikörpers an die Säule 200 µl Antikörperserum wurden auf die Säule gegeben und 60 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper und andere Serumproteine wurden durch fünfmalige Waschschrte mit 400 µl Waschpuffer (TBS mit 2 M Harnstoff, pH 7,5) und Zentrifugation ($150 \times g$, 1 min) entfernt.

Elution des Antikörpers Das mit Antikörper gebundene Säulenmaterial wurde dreimal mit Elutionspuffer (2,5 % Essigsäure) resuspendiert und die Antikörper wurden durch Zentrifugation ($1000 \times g$, 1 min) eluiert. Die aufgereinigten polyklonalen Antikörper wurden im Anschluss dialysiert und aufkonzentriert.

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

3.3.1 Wachstumsassay von *S. cerevisiae* und *E. coli* auf Agarplatten

Der Wachstumsassay von *S. cerevisiae* und *E. coli* auf Agarplatten eignet sich für die Untersuchung der Funktion der exprimierten Proteine in beiden Organismen. Dazu werden verschiedene Knockout-Stämme benötigt, deren bestimmtes Gen oder mehrere Gene für einige Funktionen deletiert ist(sind). Durch die Transformation mit exogenen Gen-haltigen Plasmiden in solchen Zellen können die fehlenden Funktionen zum Teil kompensiert werden. Je nach den Testbedingungen und Funktionalitäten der zu untersuchenden Gene gibt es verschiedene Wachstumserscheinungen.

3 Methoden

Für den Wachstumsassay von *S. cerevisiae* wurde jeweils eine große Kolonie von den transformierten Hefen aus den Platten in 1,5 ml Flüssigmedium über Nacht bei 29°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert ($13\,000 \times g$, 30 s). Das Hefepellet wurde zweimal mit 1 ml Aqua bidest. gewaschen und in 0,5 ml Aqua bidest. durch Vortexen resuspendiert. Die OD₆₀₀ dieser Hefesuspension wurde bestimmt, und daraus wurde eine neue Hefesuspension auf OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe ($OD_{600} = 1/10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}$) erstellt. Auf die für den jeweiligen Test vorbereiteten Agarplatten wurden jeweils 5 µl der Hefesuspension in der Verdünnungsreihenfolge pipettiert. Nach dem Verdünsten des Wassers wurden die Platten bei 29°C für 3-5 d inkubiert.

Für den Wachstumsassay von *E. coli* wurde die *E. coli*-Suspension genauso wie Hefesuspension präpariert. Die Verdünnungsreihen wurden jedoch auf OD₆₀₀ von 1, 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} eingestellt. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Tage.

***S. cerevisiae* Methylamin-Efflux-Assay**

Durch den Methylamin-Efflux-Assay kann die Methylamin-Leitfähigkeit von Aquaglyceoporinen phänotypisch untersucht werden [91]. Für den Assay wird der Hefestamm By4742Δfps1 verwendet, dessen eigenes endogenes Aquaglyceroporin ScFps1 deletiert ist, welches auch Methylamin leiten kann. Methylamin ist ein Ammoniak-Analogon und weist eine hohe Toxizität für die Hefezellen auf. Bei diesem Assay werden Methylamin-haltige Agarplatten (50 mM) mit drei verschiedenen pH-Werten (5,5/6,5/7,5) hergestellt. Bei diesen drei pH-Werten liegt Methylamin vorwiegend als geladenes Methylammonium ($pK_a = 10,64$) vor, die Konzentration am ungeladenen Methylamin ändert sich jedoch nach pH-Wert um Faktor 10 (0,36 µM bei pH 5,5, 3,6 µM bei pH 6,5 und 36 µM bei pH 7,5). Das geladene Methylammonium wird von drei endogenen Ammoniumtransportern Mep1-3 [92] aufgenommen und in die Zellen akkumuliert. Durch den intrazellulär vorliegenden physiologischen pH-Wert zwischen 6,8 und 7,2 in Hefezellen wird das aufgenommene Methylammonium zum Teil zum ungeladenen Methylamin deprotoniert. Bei den Platten, deren pH-Werte kleiner als der zytosolische pH-Wert sind, entsteht damit ein chemischer Gradient vom Methylamin zwischen dem Zellinneren und der Umgebung. Je niedriger der pH-Wert in Agarplatten ist, desto größer ist dieser auswärts gerichtete Methylamin-Gradient. Durch die heterolog exprimierten funktionellen Aquaglyceropore können die Hefezellen nun das Fehlen des Fps1 kompensieren und kann das Methylamin auf den Agarplatten mit niedrigen pH-Werten nach dem chemischen Gradienten ausgeschleust werden und so überleben die Hefezellen.

Für den Methylamin-Efflux-Assay wurden folgende Agarplatten hergestellt (Die

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

angegebenen Mengen reichen für 4 Agarplatten.):

Für Lösung 1 (s. Tab. 3.7) wurde der angegebene pH-Wert mit 5 M NaOH eingestellt, im Anschluss wurden pro Ansatz 2,5 g Agar hinzugegeben und die Lösungen autoklaviert.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Lösung 1 für den Methylamin-Efflux-Assay

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
Pufferlösung	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MOPS
Aqua bidest.	62 ml	62 ml	62 ml

Lösung 2 wurde in einem sterilen Gefäß nach Tabelle 3.8 vermischt und im Wasserbad bei 55°C gehalten.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Lösung 2 für den Methylamin-Efflux-Assay. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von vier Platten mit einem pH-Wert.

0,85 % YNB	24 ml
15 % D-Glucose	24 ml
1 M Methylamin	6 ml
5 % L-Prolin	2,4 ml
2 % L-Leucin	0,6 ml
2 % L-Lysin	0,2 ml
2 % L-Histidin	0,2 ml

Lösung 1 und Lösung 2 wurden bei 55°C gemischt und auf vier Platten verteilt.

***S. cerevisiae* Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay**

Der Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay dient zu der phänotypischen Untersuchung der Ammoniak- und Ammonium-Leitfähigkeit der Aquaglyceroporine [93]. Bei diesem Assay wird der Hefestamm 31019 Δ fps1 verwendet, dessen sowohl endogene Ammoniumtransporter Mep1-3 als auch endogenes Ammoniak-leitendes Aquaglyceroporin ScFps1 deletiert sind. Die Hefezellen sind auf die Aufnahme von Ammoniak als Stickstoffquelle angewiesen und können nur überleben, wenn die heterolog exprimierten Aquaglyceroporine für Ammoniak bzw. Ammonium leitfähig sind.

3 Methoden

Die beim Assay eingesetzten Agarplatten enthalten Ammoniumsulfat (2 mM) ($pK_a = 9,25$) als einzige Stickstoffquelle. Die Platten werden auf verschiedene pH-Werte (pH 4,5/5,5/6,5/7,5) eingestellt, so dass verschiedene Ammoniakkonzentrationen im Medium vorhanden ($0,036 \mu\text{M}$ bei pH 4,5, $0,36 \mu\text{M}$ bei pH 5,5, $3,6 \mu\text{M}$ bei pH 6,5 und $36 \mu\text{M}$ bei pH 7,5) sind, während die Ammoniumkonzentration fast unverändert vorwiegend im Medium vorliegt. Das starke Wachstum von Hefezellen weist damit auf die Ammoniak- bzw. Ammonium-leitenden Aquaglyceroporine hin. Bei diesem Assay ist das Hintergrundwachstum häufig zu beobachten, welches durch Membrandiffusion von Ammoniak zustande gekommen ist.

Für den Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay wurden folgende Agarplatten hergestellt (Die angegebenen Mengen reichen für 4 Agarplatten.):

Die angegebenen pH-Werte der Lösung 1 (s. Tab. 3.9) wurden mit 5 M NaOH oder HCl eingestellt, im Anschluss wurden pro Ansatz 2,5 g Agar hinzugegeben und die Lösungen autoklaviert.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Lösung 1 für den Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay

	pH 4,5		pH 5,5		pH 6,5		pH 7,5	
Pufferlösung	9,6 ml	0,5 M	9,6 ml	0,5 M	4,8 ml	1 M	4,8 ml	1 M
	Succinat		Succinat		MES		MES	
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	240 μl		240 μl		240 μl		240 μl	
Aqua bidest.	62 ml		62 ml		67 ml		67 ml	

Lösung 2 wurde in einem sterilen Gefäß nach Tabelle 3.10 vermischt und im Wasserbad bei 55°C gehalten.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Lösung 2 für den Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von vier Platten mit einem pH-Wert.

0,85 % YNB	24 ml
15 % D-Glucose	24 ml

Lösung 1 und Lösung 2 wurden bei 55°C gemischt und auf vier Platten verteilt.

***S. cerevisiae* Kalium-Aufnahme-Assay**

Der Kalium-Aufnahme-Assay dient zu der phänotypischen Untersuchung der möglichen Kalium-Leitfähigkeit von Aquaporinen. Bei diesem Assay wird der Hefe-

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

stamm CY162 verwendet, bei dem die beiden endogenen Kaliumtransporter Trk1 und Trk2 deletiert sind [94]. Bei einer niedrigen Kaliumkonzentration ($< 0,5 \text{ mM}$) im Medium können die CY162-Hefezellen nur überleben, wenn Kaliumionen über heterolog exprimierte Kanäle aufgenommen werden. Bei einer hohen Kaliumkonzentration können Kaliumionen auch durch andere unspezifische Ionenkanäle in die Zellen gelangen [95].

Die beim Assay eingesetzten Agarplatten sind Arginin-Phosphat-Platten, die sehr niedrigen Salzgehalt enthalten [96]. Die Platten werden mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen (0,1/0,5/1/2 mM) versetzt.

Für den Kalium-Aufnahme-Assay wurden folgende Agarplatten hergestellt (Die angegebenen Mengen reichen für 4 Agarplatten.):

Der pH-Wert der Lösung 1 (s. Tab. 3.11) wurde mit Phosphorsäure auf 5,5 eingestellt und anschließend pro Ansatz 5 g Agar hinzugegeben. Die fertigen Lösungen wurden im Anschluss autoklaviert.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der Lösung 1 für den Kalium-Aufnahme-Assay. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von vier Platten.

Arginin (freie Base)	0,252 g
1 M MgSO_4	24 ml
1 M CaCl_2	12 μl
Aqua bidest.	102,5 ml

Lösung 2 wurde in einem sterilen Gefäß nach Tabelle 3.12 vermischt und im Wasserbad bei 55°C gehalten.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Lösung 2 für den Kalium-Aufnahme-Assay

	KCl (0,1 mM)	KCl (0,5 mM)	KCl (1 mM)	KCl (2 mM)
15 % D-Glucose	16 ml	16 ml	16 ml	16 ml
Spurenelemente-Stammlösung	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
Vitamin-Stammlösung	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
2 % L-Histidin	120 μl	120 μl	120 μl	120 μl
2 M KCl	6 μl	30 μl	60 μl	120 μl

Lösung 1 und Lösung 2 wurden bei 55°C gemischt und auf vier Platten verteilt.

***S. cerevisiae* Glycerol-Stress-Assay**

Der Glycerol-Stress-Assay dient zur phänotypischen Untersuchung der Glycerol-Leitfähigkeit der Aquaglyceroporine [97]. Für den Assay wird Hefestamm By4742- Δ fps1 verwendet. Die Hefezellen wurden zuerst in Selektionsmedium mit Zugabe von 1 M Glycerol inokuliert und über Nacht bei 29° unter Schütteln wachsen gelassen, damit die Glycerolkonzentration zwischen dem Zellinneren und externen Medium ausgeglichen wurde und die Hefezellen einen hohen inneren Osmotischen Druck besaßen. Am folgenden Tag wurden die Hefezellen jeweils auf eine normale Agarplatte, welche für die Hefezellen als hypotonisches Medium dargestellt wurde, und eine Agarplatte mit Zugabe von 1 M Sorbitol, welche für die inkubierten Hefezellen isotonisch war, ausplattiert. Unter den hypotonischen Bedingungen sind die funktionellen Aquaglyceroporine in der Lage, den osmotischen Druck durch den Efflux vom zytosolischen Glycerol schnell auszugleichen. Die Hefezellen mit den Aquaglyceroporinen können damit ein normales Wachstum aufweisen und die Hefezellen ohne Kanäle sollen unter dem osmotischen Stress ein abgeschwächtes Wachstum zeigen. Unter den isoosmotischen Bedingungen mit Sorbitol im Medium leiten die funktionellen Aquaglyceroporine in Hefezellen das Glycerol von Innen nach Außen wegen des chemischen Glycerol-Gradienten, allerdings kann das Sorbitol nicht durch Membran passieren. Es entsteht somit ein hypotonischer Stress für die Aquaglyceroporin-haltigen Hefezellen, so dass diese Hefezellen unter diesen Bedingungen ein verringertes Wachstum zeigen. Bei den Hefezellen ohne Aquaglyceroporine gibt es dagegen keinen osmotischen Stress, da das Glycerol die Zellen nicht verlassen kann.

Für den Glycerol-Stress-Assay wurden eine normale SD HLK-Agarplatte und eine SD HLK-Agarplatte inklusive 1 M Sorbitol verwendet.

***E. coli* Antimonit-Aufnahme-Assay**

Der Antimonit-Aufnahme-Assay dient zur phänotypischen Untersuchung der Antimonit-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen. Bei diesem Assay werden transformierte *E. coli*-Zellen des SK47-Stammes verschiedenen Antimonitkonzentrationen ausgesetzt. Dem SK47-Stamm fehlen das endogene Aquaglyceroporin EcGlpF und der Arsenittransporter EcArsB, die jeweils für den Antimonit-Ausgleich zwischen Zellmembranen und die Ausscheidung vom zytosolischen Antimonit verantwortlich sind. Bei dem Antimonit-haltigen Medium sind SK47-Zellen ohne heterolog exprimierte funktionelle Antimonit-leitende Aquaglyceroporine noch überlebensfähig. Ein reduziertes Wachstum von Zellen ist auf den Einstrom vom ungeladenen Antimonit durch das Aquaglyceroporin zurückzuführen.

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

Die beim Assay eingesetzten Agarplatten waren LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika und zwei Antimonitkonzentrationen (0,25 mM und 0,5 mM). Für die Induktion der Proteinexpression wurden 40 µl IPTG-Lösung (100 mM) kurz vor dem Assay auf die Platten ausplattiert.

***E. coli* Arsenat-Resistenz-Assay**

Bei dem Arsenat-Resistenz-Assay wird das Wachstum von den transformierten *E. coli*-Zellen des SK47-Stammes auf LB-Agarplatten mit verschiedenen Arsenatkonzentrationen analysiert. Bei dem SK47-Stamm wurden das gesamte *ars*-Operon für die Arsenat-Resistenz in *E. coli* sowie das Arsenit-leitende EcGlpF deletiert. Dieser Stamm ist daher hoch Arsenat-sensitiv und kann auf den Arsenat-haltigen Platten ohne heterolog exprimierte funktionelle Arsenatreduktasen und Arsenit-leitende Kanäle nicht überleben. Ein deutliches Wachstum von transformierten SK47-Zellen deutet auf eine Arsenatreduktase-Aktivität und Arsenit-Leitfähigkeit vom heterolog exprimierten Protein hin.

Die beim Assay eingesetzten Agarplatten sind LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika und verschiedenen Arsenatkonzentrationen (0,1 mM und 0,25 mM und 0,5 mM). Für die Induktion der Proteinexpression wurden 40 µl IPTG-Lösung (100 mM) kurz vor dem Assay auf die Platten ausplattiert.

3.3.2 Direkter Arsenit-Aufnahme-Assay

Die jeweils mit den zu untersuchenden Aquaporinen (einschl. Positivkontrolle und Negativkontrolle) transformierten Hefezellen (Hefestamm BY4742 Δ fps1 Δ acr2,3- Δ ycf1) wurden in 50 ml SD HLK-Medium unter Schütteln bis zu OD₆₀₀ 1.3 inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (2 500 × g, 5 min) und in frischem SD HLK-Medium auf eine OD₆₀₀ von 10 resuspendiert. Dazu wurde eine Arsenit-Stammlösung (100 mM) gegeben, bis die Arsenitkonzentration 1 mM im Medium betrug. Die Zellen wurden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und 100 µl Proben aus jeweiligen Assayansätzen wurden in 10-Min Interval entnommen. Die Zellen wurden sofort dreimal mit Eiskaltem Aqua bidest. gewaschen und das Pellet wurde in 65 % Salpetersäure bei 70°C für 20 min lysiert. Die Menge des aufgenommenen Arsenits im Zytosol wurde durch ein Atomabsorptionsspektrometer bestimmt.

3.3.3 Leitfähigkeitsmessung mit der Stopped-Flow-Apparatur

Das Messprinzip der Stopped-Flow-Apparatur beruht auf einem schnellen Mischen von zwei oder mehrere Flüssigkeiten in einer Küvette und einer dynamischen Aufnahme der spektroskopischen Änderung in der Mischung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zu untersuchenden Hefe-Protoplasten (s. u.) in verschiedenen Osmolyt-basierten Puffersystemen präpariert. Durch das Mischen der Protoplastsuspension mit verschiedenen osmotischen (hyperosmotischen, isoosmotischen) Testpuffern konnten die osmotischen Verhältnisse außerhalb der Zellen schlagartig geändert werden. Es folgte eine Schrumpfung oder Schwellung der Protoplasten und eine Änderung der Lichtstreuung, was spektroskopisch aufgenommen werden konnte.

Präparation der Protoplasten aus *S. cerevisiae*

Protoplasten sind die lebenden Hefezellen ohne rigide Zellwand. Um ein besseres Singal-Rausch-Verhältnis bei der Stopped-Flow-Messung zu ermöglichen wurden Protoplasten aus Hefezellen präpariert. Der Abbau der Zellwand von Hefezellen erfolgte mit einem Enzymgemisch (Zymolyase-20T), was neben β -1,3-Glucanasen zum Abbau der Zellwand auch andere Proteasen enthält. Zur Präparation der Protoplasten wurde ein publiziertes Protokoll übernommen [98, 99] und zum Teil modifiziert.

Nach der Hefetransformation wurden 40 ml SD HLK-Medium mit der zu untersuchenden Hefekolonie angeimpft und anschließend über Nacht bei 29°C unter Schütteln inkubiert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,2 am nächsten Tag wachsen gelassen. Die Hefekultur wurde zentrifugiert (2 500 × g, 4°C, 5 min) und anschließend wurde das Nasspellet-Gewicht (ca. 40 mg) notiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 2 ml Puffer I resuspendiert und für 15 min bei 29°C unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurden 4 ml Puffer II (1,8 M Osmolyt), 100 mg BSA und Zymolyase 20 T entsprechend dem Nasspellet-Gewicht (200 U Zymolyase-20T/g Nasspellet) hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 29°C für 60 min unter leichtem Schütteln (100 rpm). Im Anschluss wurden die gebildeten Protoplasten zentrifugiert (2 000 × g, 4°C, 5 min) und das Pellet mit 5 ml Puffer III (1,2 M Osmolyt) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (2 000 × g, 4°C, 5 min) wurde das Pellet in 2 ml Puffer III (1,2 M Osmolyt) resuspendiert und die OD₆₀₀ der Protoplasten-Suspension bestimmt. Für die Leitfähigkeitsmessung der Protoplasten mit der Stopped-Flow-Apparatur wurde diese Protoplastsuspension mit Puffer III (1,2 M Osmolyt) auf eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt. Die präparierten Protoplasten konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert

werden.

Leitfähigkeitsmessung der Protoplasten mit der Stopped-Flow-Apparatur

Es konnten sowohl die Wasser- als auch die Solut-Leitfähigkeit von Protoplasten mit der Stopped-Flow-Apparatur getestet werden.

Für die Wasser-Leitfähigkeitsmessung konnten die Protoplasten in Puffer III (1,2 M Osmolyt) mit einer hyperosmotischen Testpuffer (1,2 M Osmolyt) in der Stopped-Flow-Apparatur gemischt werden. Es entstanden damit ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient und anschließend folgte ein Wasserausstrom durch die zu untersuchenden Aquaporine oder Diffusion. Durch die Abnahme des Protoplasten-Volumens stieg das Streulichtsignal. Die Wasser-Leitfähigkeit war damit proportional zu den Schrumpfraten der Messkurven.

Für die Solut-Leitfähigkeitsmessung wurden die Protoplasten in Puffer III (1,2 M Osmolyt) mit entweder einer Solut-haltigen hyperosmotischen Testpuffer (1,2 M Osmolyt + 0,6 M Solut) oder einer Solut-haltigen isoosmotischen Testpuffer (0,6 M Osmolyt + 0,6 M Solut) in der Stopped-Flow-Apparatur gemischt. In dem ersten Fall entstand eine typische zweiphasige Kurve für die Solut-leitenden Aquaglyceroporine. Bei der ersten Phase nahm das Protoplasten-Volumen durch den Wasserausstrom ab. Es führte zu einer Zunahme von der Lichtstreuung. Bei der zweiten Phase wurden die Solute durch die Aquaglyceroporine langsam in die Protoplasten aufgrund des chemischen Gradienten geleitet. Die Osmolarität in den Protoplasten und das Protoplasten-Volumen wurden zum Teil kompensiert, so dass die Streulichtintensität wieder abnahm. In dem zweiten Fall nach dem Mischen gab es ausschließlich einen chemischen Gradienten. Durch den Einstrom von Soluten in die Protoplasten durch die Aquaglyceroporine entstand somit ein osmotischer Gradient. Es folgte anschließend die Wasserzufuhr und die Zunahme des Protoplasten-Volumens. Die Streulichtintensität nahm ab. Die Solut-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen konnte daher durch die Schwellungsraten der Messkurven charakterisiert werden.

Parametereinstellung für die Stopped-Flow-Messung

Um die Messdaten direkt vergleichen zu können, wurden die Parameter für die Stopped-Flow-Messung einheitlich eingestellt (s. Tab. 3.13).

3 Methoden

Tabelle 3.13: Angaben der Geräteeinstellung für die Stopped-Flow-Messung von Protoplasten

Xe/Hg-Bogenlampe	100 W
Monochromator	436 nm
Output Filter	300 μ s
Photomultiplier	400 \times
Temperatur	20°C
Injektionsvolumen	202 μ l
Injektionsgeschwindigkeit	14 ml/s
erwartete Totzeit	2,6 ms
Datenpunkte	8000

Auswertung der Messkurven

Für jede Probe wurden 6-9 Messkurven aufgenommen und alle Kurven mit der BioKine Software gemittelt. Zur Auswertung der Stopped-Flow-Messdaten sind mehrere Ergebnis-Darstellungen möglich.

Auswertung der Wasser-Leitfähigkeit Für die Wasser-Leitfähigkeitsmessung mit dem hyperosmotischen Testpuffer ergab sich eine steigende exponentielle Kurve wegen des Wasseraustritts bzw. der Schrumpfung von Protoplasten. Die gemittelte Kurve wurde von 0 bis 1 normalisiert, d. h. der Startpunkt wurde auf 0 gezogen und die Kurve mit ihrer Plateauphase auf 1 multipliziert.

- Ratenkonstante k_{Wasser}

Die Ratenkonstante für die Wasser-Leitfähigkeit auch kurz als k_{Wasser} -Wert (in s^{-1}) genannt ist proportional zur Wasser-Leitfähigkeit und wird durch ein einfach (s. Gl. 3.4) oder zweifach (s. Gl. 3.5) exponentielles Kurvenfitting von den normalisierten Kurven mit der SigmaPlot Software ermittelt.

$$y = a \cdot (1 - e^{-k_{\text{Wasser}} \cdot t}) \quad (3.4)$$

$$y = a \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + b \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (3.5)$$

a in Gl. 3.4 bzw. a und b in Gl. 3.5 sind jeweils die Amplitude der gefitteten Kurven. Bei den 0-1 normalisierten Kurven sollen sie (a in Gl. 3.4 bzw. $a + b$ in Gl. 3.5) bei 1 liegen. k_{Wasser} in Gl. 3.4 bzw. k_1 und k_2 in Gl. 3.5 sind die ermittelten Ratenkonstanten für die Wasser-Leitfähigkeit. Bei dem zweifach

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

exponentiellen Kurvenfitting wird der gesamte k_{Wasser} -Wert aus k_1 und k_2 mit der Formel (3.6) berechnet [100].

$$k_{\text{Wasser}} = \frac{a \cdot k_1 + b \cdot k_2}{a + b} \quad (3.6)$$

- τ -Wert

Bei der Schrumpfkurve handelt es sich um eine e -abhängige Funktion. Daher ist es möglich, den τ -Wert direkt aus der Kurvengrafik abzulesen. Man geht von dem Ordinatenwert 0,632 (berechnet aus $1 - 1/e$) bei den 0-1 normalisierten Kurven aus und liest dann den Abszissenwert ab. Der τ -Wert hat damit die Einheit s und mathematisch gesehen ist $1/k_{\text{Wasser}}$, wenn die Kurve genau mit einer einfach Exponentiellen Funktion gefittet werden kann.

- Koeffizient der Wasser-leitfähigkeit

Der Koeffizient der Wasser-Leitfähigkeit P_f -Wert (in $\mu\text{m/s}$) ist ein Maß für die Transportgeschwindigkeit von Wasser über Membranen. Der Koeffizient wurde über die Formel 3.7 berechnet.

$$P_f = \frac{k_{\text{Wasser}} \cdot V_0}{S_0 \cdot V_w \cdot c} \quad (3.7)$$

Angenommen ist der durchschnittliche Durchmesser der Protoplasten von $5\mu\text{m}$. Dabei wird das Volumen einer Protoplast $V_0 = 6,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3$, die Oberfläche einer Protoplast $S_0 = 7,9 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$ berechnet. Das molekulare Wasservolumen V_w liegt bei $18 \text{ cm}^3/\text{mol}$ und der osmotische Gradient c^1 zwischen dem Protoplasteninneren und der externen Lösung bei diesem Test beträgt 300 mOsm/l .

Auswertung der Solut-Leitfähigkeit

- Ratenkonstante k_{Solut} bei der hyperosmotischen Messung

Die Solut-Leitfähigkeitsmessung von Aquaglyceroporinen mit einer Solut-haltigen hyperosmotischen Testpuffer hat normalerweise einen zweiphasigen Kurvenverlauf zur Folge, der der typischen Bateman-Funktion ähnelt. Der

¹Der Begriff c in der Formel ist bisher noch nicht geeinigt. In einigen Publikationen wurde c als Osmolarität in externer Lösung angenommen. In der vorliegenden Arbeit wurde c als der osmotische Gradient zwischen den Protoplastenmembranen berechnet. Allerdings sind die k_{Wasser} -Wert bzw. τ -Wert für den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Aquaporinen entscheidend, solange alle Messungen unter gleichen Testbedingungen durchgeführt sind.

3 Methoden

Startpunkt der gemittelte Kurve wurde zuerst auf 0 gezogen und anschließend wurde die ganze Kurve mit der Bateman-Funktion (s. Gl. 3.8) mit der SigmaPlot Software gefittet.

$$y = a \cdot (1 - e^{-k_{\text{Wasser}}}) + b \cdot e^{-k_{\text{Solut}}} \quad (3.8)$$

a bzw. b in 3.8 sind jeweils die Amplitude für den Wasserausstrom und Soluteinstrom. k_{Wasser} und k_{Solut} sind die ermittelten Ratenkonstanten jeweils für die Wasser-Leitfähigkeit und Solut-Leitfähigkeit.

Für die Abschätzung und den direkten Vergleich der Solut-leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen bei der hyperosmotischen Messung kann auch die normalisierte zweiphasige Kurve genommen werden. Dazu wurde die gesamte Signaländerung der kurve von 0 bis 1 normalisiert. Die Steigung der zweiten Phase im Kurvenverlauf war proportional zur Solut-Leitfähigkeit.

- Ratenkonstante k_{Solut} bei der isoosmotischen Messung
Die Solut-Leitfähigkeitsmessung von Aquaglyceroporinen unter der isoosmotischen Testbedingung zeigt einen exponentiellen Kurvenverlauf. Die gemittelte Kurve wurde mit der Formel 3.9 bei der SigmaPlot Software gefittet.

$$y = a + b \cdot e^{-k_{\text{Solut}}} \quad (3.9)$$

a ist das Streulichtsignal, das nach der Erreichung der Plateauphase immer im System vorhanden ist. b ist die Amplitude der Sigaländerung wegen des Soluteinstroms. k_{Solut} ist die ermittelte Ratenkonstante für die Solut-Leitfähigkeit.

Um die Messkurven von verschiedenen Aquaglyceroporinen in eine Abbildung darstellen und direkt vergleichen zu können, konnten die Kurven so normalisiert werden, dass a und b jeweils 0 und 1 betragen und k_{Solut} unverändert blieb.

- Koeffizient der Solut-Leitfähigkeit
Der Koeffizient der Solut-Leitfähigkeit P_{Solut} -Wert (in $\mu\text{m/s}$) ist ein Maß für die Transportgeschwindigkeit von Soluten über Membranen. Der Koeffizient wurde über die Formel 3.10 berechnet.

$$P_{\text{Solut}} = \frac{k_{\text{Solut}} \cdot V_0 \cdot c_{\text{tot}}}{S_0 \cdot c_{\text{diff}}} \quad (3.10)$$

3.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

Dazu ist k_{Solut} die durch das Kurvenfitting ermittelte Ratenkonstante oder Steigung der normalisierten zweiten Phase bei der hyperosmotischen Messung (in s^{-1}). V_0 und S_0 sind jeweils das Volumen und die Oberfläche einer Protoplast wie die Formel 3.7. c_{tot} ist die gesamte Solutkonzentration und c_{diff} ist der chemische Gradient der durch die Aquaglyceropore geleiteten Solute.

3.3.4 Enzymatische Assays

Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-Enzymassay

Für diesen Enzymassay wurde Ellman's Reagenz als Substrat eingesetzt. Ellman's Reagenz chemisch gesehen ist 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Sie dient eigentlich zur quantitativen Bestimmung von Thiol-Gruppen in Proteinen. Bei diesem Enzymassay (s. Abb. 3.3) wurde die Disulfidbindung von DTNB ebenfalls gespalten, dabei wurden die beiden Thiolgruppen des Thioredoxins zu einer Disulfidbindung oxidiert. Durch die Thioredoxinreduktase wurde das oxidierte Thioredoxin unter Verbrauch von NADPH/ H^+ reduziert. Das gespaltene Produkt NTB (2-Nitro-5-thiobenzoessäure) konnte in einem 100 μl Reaktionsansatz (0,4 mM DTNB, 0,5 mM NADPH, 4 μM Thioredoxinreduktase, 2 mM EDTA, 100 mM Tris und unterschiedliche Zugaben von Thioredoxin von 0-30 mM) bei 412 nm detektiert werden.

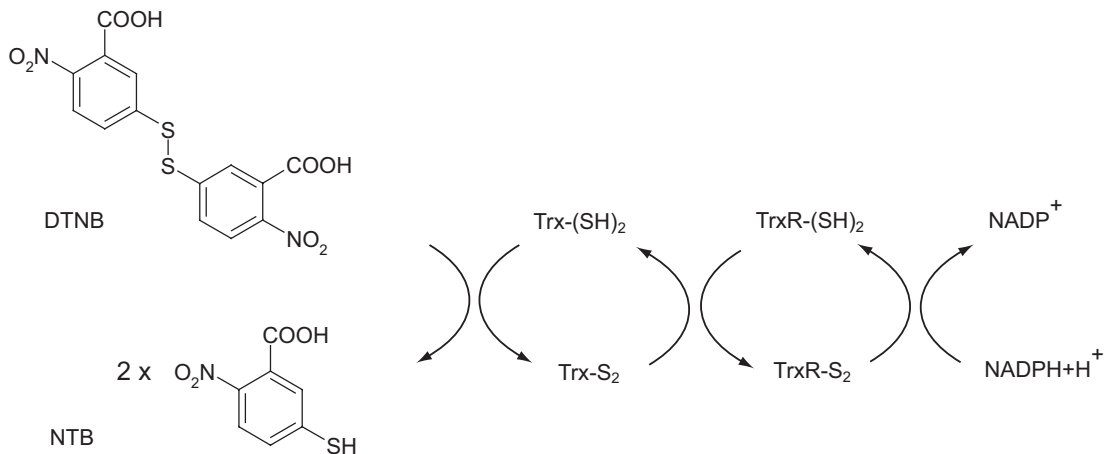


Abbildung 3.3: Reaktionsmechanismus der DTNB-Reduktion durch Thioredoxin und Thioredoxinreduktase

Arsenatreduktase-Enzymassay

Die Bestimmung der Arsenatreduktase-Aktivität von heterolog exprimierten und aufgereinigten Arsenatreduktasen erfolgte nach der in der Literatur [59] beschriebenen Methode. Dabei wurde die Abnahme von NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6\,200\text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) in einem 100 μl Reaktionsansatz (0,25 μM Arsenatreduktase, 6,72 μM *E. coli* Thioredoxin, 0,345 μM *E. coli* Thioredoxinreduktase, 125 μM NADPH, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 und unterschiedliche Zugaben von Arsenat (0–400 mM)) photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Phosphotyrosinphosphatase-Enzymassay

Die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität der Arsenatreduktase wurde durch die Umsetzung des farblosen Substrats 4-Nitrophenyl-phosphat (pNPP) in das gelb gefärbte Produkt p-Nitrophenol (pNP) ($\epsilon_{\text{pNP}} = 18\,000\text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) bestimmt (s. Abb. 3.4).

Der Reaktionsansatz (100 μl) setzte sich aus 10 μM aufgereinigte Arsenatreduktase, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 und unterschiedliche pNPP-Konzentrationen (0–20 mM). Die Zunahme der Absorption bei 405 nm wurde gemessen.

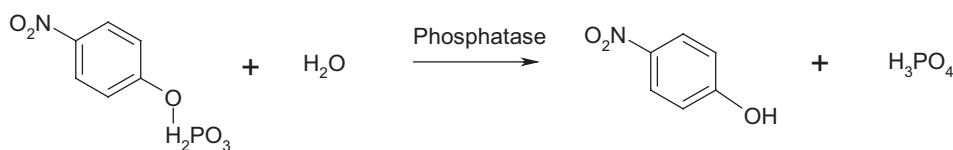


Abbildung 3.4: Enzymatische Hydrolyse des künstlichen Substrats pNPP durch Phosphatase (Arsenatreduktase)

3.4 Konstruktion der Klonierungsarbeiten und der bereits subklonierten Plasmide

Die in dieser Arbeit hergestellten Konstruktionen wurden sequenziert. In der Tabelle sind die Herkunft, Schnittstellen ggf. verwendeten Primer angegeben.

Name	Vektor	Herkunft und Schnittstellen	ggf. Pri-mer
634-pBS	pBluescript II SK(-) (BamHI/EcoRV)	gDNA-PCR-634 (BamHI/blunt)	(1), (2)

3.4 Konstruktion der Klonierungsarbeiten und der bereits subklonierten Plasmide

<i>Name</i>	<i>Vektor</i>	<i>Herkunft und Schnittstellen</i>	<i>ggf. Pri- mer</i>
1447-pBS	pBluescript II SK(-) (BamHI/EcoRV)	gDNA-PCR-1447 (BamHI/blunt)	(7), (8)
634-HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/XhoI)	634-pBS (BamHI/XhoI)	
1447-HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/EcoRI)	634-pBS (BamHI/EcoRI)	
634-AQPD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/XhoI)	gDNA-PCR-634-AQPD (BamHI/XhoI)	(1), (3)
634-ArsCD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/SmaI)	gDNA-PCR-634-ArsCD (BamHI/blunt)	(2), (5)
1447-AQPD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/EcoRI)	gDNA-PCR-1447-AQPD (BamHI/EcoRI)	(7), (9)
1447-ArsCD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/SmaI)	gDNA-PCR-1447-ArsCD (BamHI/blunt)	(8), (11)
634-ArsCD- pQE30	pQE30 (BamHI/HindIII)	634-ArsCD-HA426 (BamHI/HindIII)	
1447-ArsCD- pQE30	pQE30 (BamHI/HindIII)	1447-ArsCD-HA426 (BamHI/HindIII)	
634-AQPD- 1447-ArsCD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/SmaI)	gDNA-PCR-634-AQPD (BamHI/EcoRI), gDNA-PCR-1447-ArsCD (EcoRI/blunt)	(1), (3), (8), (12)
1447-AQPD- 634-ArsCD- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/SmaI)	gDNA-PCR-1447-AQPD (BamHI/EcoRI), gDNA-PCR-634-ArsCD (EcoRI/blunt)	(2), (6), (7), (9)
634-pQE30	pQE30 (BamHI/SalI)	Strop634-HA426 (BamHI/XhoI)	
1447-pQE30	pQE30 (BamHI/HindIII)	Strop1447-HA426 (BamHI/HindIII)	
StTrx1-pTrc	pTrc-10His-Xa (EcoRI/BamHI)	gDNA-PCR-StTrx1 (EcoRI/BamHI)	(13), (14)
StTrx2-pTrc	pTrc-10His-Xa (EcoRI/BamHI)	gDNA-PCR-StTrx2 (EcoRI/BamHI)	(15), (16)
StTrxR-pTrc	pTrc-10His-Xa (EcoRI/BamHI)	gDNA-PCR-StTrxR (XhoI/BamHI) mit Adapter (EcoRI/XhoI)	(17), (18), (19), (20)
EtAQP2- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/HindIII)	gDNA-PCR-EtAQP2 (BamHI/HindIII)	(21), (22), (25), (26)
EtAQP2a- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/HindIII)	gDNA-PCR-EtAQP2a (BamHI/HindIII)	(21), (23), (25), (26)
EtAQP2b- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/HindIII)	gDNA-PCR-EtAQP2b (BamHI/HindIII)	(22), (24)
TgAQP2- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/HindIII)	gDNA-PCR-TgAQP2 (BamHI/HindIII)	(27), (28)
TgAQP2a- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/XhoI)	gDNA-PCR-TgAQP2a (BamHI/XhoI)	(27), (29)
TgAQP2b- HA426	pHA_RS426MET25 (BamHI/HindIII)	gDNA-PCR-TgAQP2b (BamHI/HindIII)	(28), (30)

3 Methoden

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Aquaporin-Arsenatreduktase-Fusionsproteine Strop634 und Strop1447 aus *S. tropica*

Die Daten zu diesem Kapitel sind bereits veröffentlicht in „Novel channel enzyme fusion proteins confer arsenate resistance.“ (*J Bio Chem*) [101] und „Functional and evolutionary implications of natural channel-enzyme fusion proteins.“ (*BioMol Concepts*) [102].

4.1.1 Sequenzvergleich der Strop634 und Strop1447

Strop634 und Strop1447 bestehen jeweils aus einer Aquaporin-Domäne, einer Arsenatreduktase-Domäne und einem Linker dazwischen (s. Tab. 4.1). Beim Sequenzvergleich wurden die beiden Domänen getrennt betrachtet.

Tabelle 4.1: Zuordnung der Proteinsequenz in Strop634 und Strop1447

	Aquaporin-Domäne	Linker	Arsenatreduktase-Domäne	gesamt
Strop634	243 aa	40 aa	170 aa	453 aa
Strop1447	243 aa	37 aa	134 aa	414 aa

Vergleich der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447

Sequenzalignment und Stammbaumanalyse der Aquaporin-Domänen von Strop-634 und Strop1447 Ein durchgeführtes Alignment der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447 wies eine hohe Ähnlichkeit (83 % identische bzw. 90 % ähnliche Proteinsequenz) zwischen den beiden Aquaporin-Domänen auf. Die

4 Ergebnisse

Stammbaumanalyse mit zehn human-Aquaporinen, sowie anderen bekannten Aquaporinen z. B. dem orthodoxen Aquaporin EcAQPZ und den Aquaglyceroporinen EcGlpF und PfAQP zeigte, dass die beiden Aquaporin-Domänen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu der Aquaglyceroporin-Subfamilie gehören (s. Abb. 4.1).

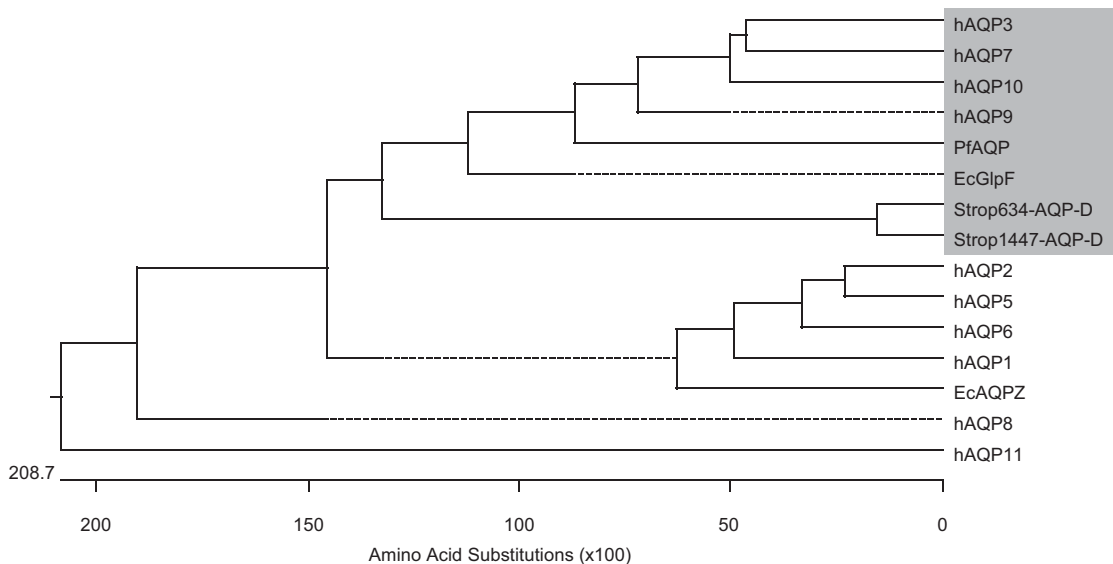


Abbildung 4.1: Stammbaumanalyse der Aquaporin-Domäne (AQP-D) von Strop634 und Strop1447 mit einigen bekannten Aquaporinen. Der dunkelgrau markierte Kasten ist die Aquaglyceroporin-Subfamilie. (Alignment durchgeführt mit Clustal W-Methode, Erstellung der Abbildung mit MegAlign)

Vergleich der NPA- und aromatischen/Arginin-Region (ar/R) der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447 Die NPA- und ar/R-Region sind die wichtigen Filterregionen für die Funktionalität und Selektivität der Aquaporine. Der Sequenzvergleich der beiden putativen Regionen¹ der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447 mit dem orthodoxen Aquaporin hAQP1 und einigen bekannten Arsenit-leitenden Aquaglyceroporinen ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Die NPA-Region von den beiden Aquaporin-Domänen besteht in der gleichen Weise aus N75PV und N186PA. Die beiden für die Aquaporine hoch konservierten Asparagine sind auch bei beiden Aquaporin-Domänen zu finden. Nur beim ersten NPA-Motiv ist die dritte Aminosäure Alanin gegen Valin getauscht. Alanin und Valin beide sind unpolare aliphatische Aminosäuren. Dieser Austausch kann in der Natur manchmal vorkommen und wird die Wasser- und Solut-Leitfähigkeit normalerweise nicht beeinflussen [19].

¹Die Sequenz der Filterregionen wurde putativ durch Sequenzalignment festgestellt.

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

Tabelle 4.2: Vergleich der Filterregionen (NPA-Region und ar/R-Region) der Aquaporin-Domänen (AQP-D) von Strop634 und Strop1447 mit dem orthodoxen hAQP1 und einigen Arsenit-leitenden Aquaglyceroporinen

	NPA-Region	ar/R-Region
hAQP1	NPA, NPA	FHCR
EcGlpF	NPA, NPA	WGFR
ScFps1	NPS, NLA	WNTR
AQP7	NAA, NPS	FGYR
AQP9	NPA, NPA	FACR
Strop634-AQP-D	N75PV, N186PA	N51 S183 V189 R193
Strop1447-AQP-D	N75PV, N186PA	N51 S183 V189 R193

Die ar/R-Region ist die engste Stelle im Aquaporin-Kanal und dient als Größenausschluss für die Solute. Die putative ar/R-Region der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447 sind mit gleichen Aminosäuren N51, S183, V189 und R193 aufgebaut. Das hoch konservierte Arginin ist auch bei den beiden zu sehen. Das kleine und neutrale Serin auf Position 183 unterscheidet sich deutlich vom großen und geladenen H180 in hAQP1, welches typisch für die orthodoxen Aquaporine ist.

Aufgrund der Vergleichsergebnisse sprechen die beiden Aquaporin-Domänen eher für die Aquaglyceroporine.

Vergleich der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Sequenzalignment und Stammbaumanalyse der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 Die beiden Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 wiesen ebenfalls eine relativ hohe Ähnlichkeit (69 % identische bzw. 82 % ähnliche Proteinsequenz) auf. Die Stammbaumanalyse mit sechs bereits charakterisierten Arsenatreduktasen aus vier unterschiedlichen Arsenatreduktase-Familien zeigte, dass die Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 deutlich zur Arsenatreduktase-Familie aus grampositiven Bakterien gehören (s. Abb. 4.2), die normalerweise das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (Trx/TrxR-System) als Reduktionsintermediat für den Reaktionszyklus braucht.

Vergleich des putativen Aktivzentrums der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 Anhand der bereits aufgeklärten Kristallstrukturen von einigen Arsenatreduktasen aus verschiedenen Arsenatreduktase-Familien ist das

4 Ergebnisse

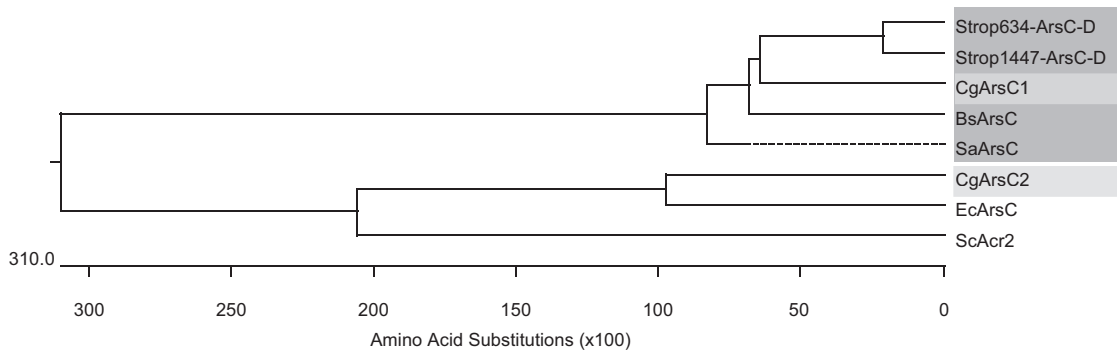


Abbildung 4.2: Stammbaumanalyse der Arsenatreduktase-Domänen (ArsC-D) von Strop634 und Strop1447 mit einigen bekannten Arsenatreduktasen. Der dunkelgrau markierte Kasten ist die typische Arsenatreduktase-Familie aus den grampositiven Bakterien. Die mit dem hellgrauen Kasten markierten CgArsC1 und CgArsC2 sind zwei vor kurzem entdeckte Arsenatreduktasen aus einem grampositiven Bakterium *C. glutamicum* [69]. Die beiden Arsenatreduktasen aus *C. glutamicum* benutzen Mycothiol/Mycoredoxin/Mycothionreduktase-System (MSH/Mrx/MR-System) für ihre Arsenatreduktion, was bisher untypisch sind. (Alignment durchgeführt mit Clustal W-Methode, Erstellung der Abbildung mit MegAlign)

Aktivzentrum für die jeweilige Arsenatreduktase sehr charakteristisch. Das Aktivzentrum der Arsenatreduktasen besteht je nach den Arsenatreduktase-Familien aus einem bzw. drei Cysteinen. Für die Arsenatreduktase-Familie aus den grampositiven Bakterien sind typischerweise drei Cysteine in ihrem Aktivzentrum zu sehen, was zu der Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 (C11(293), C85(367), C89(371))² gut passt. Ein bisschen erstaunlich ist die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447: trotz der hohen Ähnlichkeit zu der von Strop634 gibt es nur ein einziges Cystein (C11(290))³ in der Proteinsequenz (s. Tab. 4.3).

Aufgrund der Vergleichsergebnisse wurde vermutet, dass die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 zur typischen Arsenatreduktase-Familie der grampositiven Bakterien gehört. Wegen der hohen Sequenzähnlichkeit wurde die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 trotz einiger fehlender Cysteine in der gleichen Weise wie die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 in dieser Arbeit getestet.

²Die in zweiten Klammern eingesetzten Zahlen sind die Cystein-Positionen im Fusionsprotein Strop634

³Die in zweiten Klammern eingesetzte Zahl ist die Cystein-Position in Fusionsprotein Strop1447

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

Tabelle 4.3: Vergleich des putativen Aktivzentrums der Arsenatreduktase-Domänen (ArsC-D) von Strop634 und Strop1447 mit einigen bekannten Arsenatreduktasen aus verschiedenen Arsenatreduktase-Familien

Arsenatreduktase	Cysteine in Proteinsequenz	Aktivzentrum bildende Cysteine
EcArsC (G ⁻ Bakterium)	C12, C106	C12
SaArsC (G ⁺ Bakterium)	C10, C15, C82, C89	C10, C15, C82
BsArsC (G ⁺ Bakterium)	C10, C15, C82, C89	C10, C15, C82
CgArsC1 (G ⁺ Bakterium)	C8	C8
CgArsC2 (G ⁺ Bakterium)	C11	C11
ScAcr2 (Eukaryont)	C76, C106, C119	C76
Strop634-ArsC-D	C11, C85, C89	C11?, C85?, C89?
Strop1447-ArsC-D	C11	C11?

4.1.2 Ergebnisse der vorherigen Diplomarbeit

In der vorherigen Diplomarbeit wurden die beiden Gene von Strop634 und Strop1447 aus der genomischen DNA von *S. tropica* in einen Hefe-Expressionsvektor subkloniert. Die vollständige Expression sowohl von den Fusionsproteinen als auch von den jeweiligen Domänen wurde beim Western Blot bestätigt (s. Abb. 4.3).

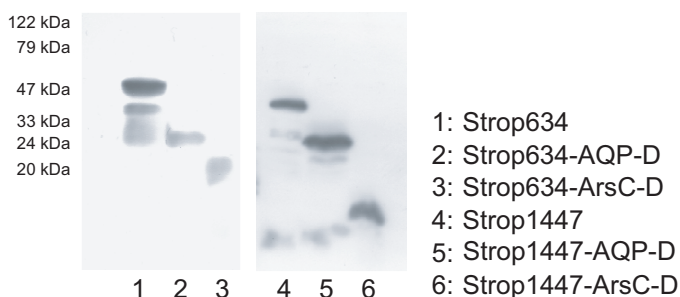


Abbildung 4.3: Western Blot der mikrosomalen Fraktion der mit Strop634 (48,5 kDa), Strop1447 (44,5 kDa) und der jeweiligen Aquaporin-Domäne Strop634-AQP-D (30,5 kDa), Strop1447-AQP-D (30 kDa) transformierten Hefezellen, sowie der zytosolischen Fraktion der mit der Arsenatreduktase-Domäne Strop634-ArsC-D (19,5 kDa), Strop1447-ArsC-D (16 kDa) transformierten Hefezellen. Alle Proteine wurden mit Hämagglutinin getagget. Pro Spur wurde 45 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Primärantikörper (Maus-Anti-HA) und Sekundärantikörper (Anti-Maus) wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt. Alle detektierten Banden waren auf der erwarteten Höhe zu finden.

4 Ergebnisse

Die Arsenatreduktase-Aktivität sowie die Arsenit-leitfähigkeit von Strop634 wurden phänotypisch in den transformierten Hefezellen nachgewiesen (s. Abb. 4.4).

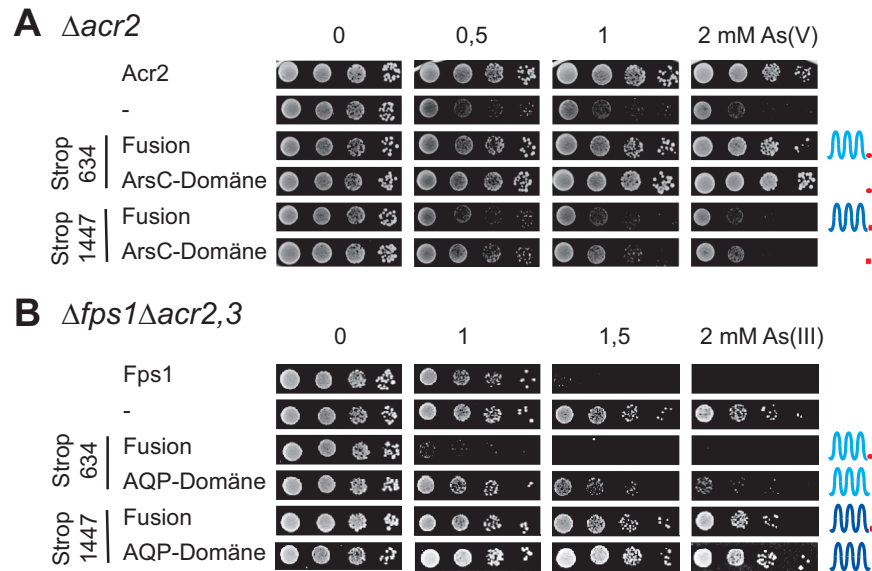


Abbildung 4.4: **A:** Arsenat-Resistenz-Assay mit einem Arsenat-sensitiven Hefestamm BY4742 $\Delta acr2$. Für den Assay wurde das Wachstum von den mit Fusionsgenen (strop634 und strop1447) sowie Arsenatreduktase-Domänen (strop634-ArsC-D und strop1447-ArsC-D) transformierten Hefezellen auf den Arsenat-haltigen Platten untersucht. Das Wachstum von den Hefezellen wies auf eine funktionelle Arsenatreduktase in Hefezellen hin. **B:** Arsenit-Aufnahme-Assay mit einem Arsenit-unempfindlichen Hefestamm BY4742 $\Delta fps1 \Delta acr2,3$. Für den Assay wurde das Wachstum von den mit den Fusionsgenen (strop634 und strop1447) sowie Aquaporin-Domänen (strop634-AQP-D und strop1447-AQP-D) transformierten Hefezellen auf den Arsenit-haltigen Platten analysiert. Das abgeschwächte Wachstum von Hefezellen wies eine Arsenit-leitende Funktion von Aquaporinen auf.

4.1.3 Vorarbeiten für die funktionelle Charakterisierung von Strop634 und Strop1447

Knockout des arsRBC-Operons in *E. coli* - Herstellung des SK47-*E. coli*-Stammes

Um die Funktion von Strop634 und Strop1447 in *E. coli* zu untersuchen und charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Knockout *E. coli*-Stamm SK47 erzeugt, dessen chromosomales arsRBC-Operon für die Arsen-Resistenz in *E. co-*

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

li-Stamm SK46 deletiert wurde. Dazu wurde das von Datsenko [103] beschriebene λ -Red-Rekombinase-System benutzt.

Design und Klonierung des Knockout-Konstruktes Der *E. coli*-Stamm, bei dem das *arsRBC*-Operon ausgeknockt werden soll, ist *E. coli*-Stamm SK46, dessen eigenen chromosomalen Gene für das orthodoxe Aquaporin EcAQPZ und Aquaglyceroporin EcGlpF bereit deletiert wurden [87].

Für das Knockout-Konstrukt wurden zwei PCRs mit der genomischen DNA von SK46-*E. coli* als Template durchgeführt. Durch zwei PCR-Schritte wurden ein 5'-Linkerarm mit 883 bp (NotI/EcoRI) und 3'-Linkerarm (HindIII/KpnI) mit 1145 bp, die sich oberhalb und unterhalb des *arsRBC*-Operons in Genom befinden, amplifiziert und anschließend wurden sie in den PIJ773-Vektor *upstream* (NotI/EcoRI) und *downstream* (HindIII/KpnI) der Apramycin-Resistenzkassette ligiert (s. Abb. 4.5). Das linearisierte Apramycin-Resistenzkassette-haltige Knockout-Konstrukt (verdaut mit NotI und KpnI) wurde aufgereinigt und anschließend durch Ethanol-Fällung aufkonzentriert.

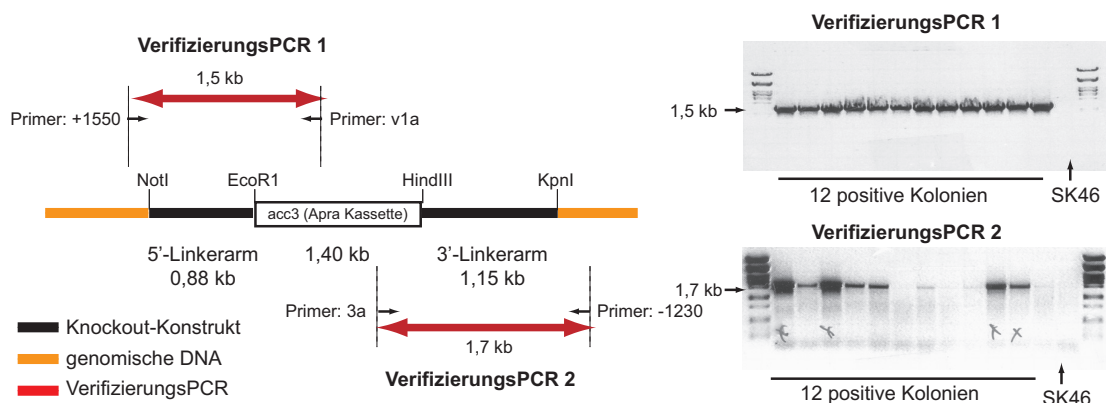


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Knockout-Konstruktes für das *ars*-Operon und des genomischen Konstruktes nach der homologen Rekombination bzw. die erwarteten PCR-Produkte nach den Verifizierungs-PCRs

Elektroporation und Inkubation Für die Elektroporation wurden bereits mit pRed/ET (amp)⁴ transformierte SK46-Zellen in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 30°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Kultur 1:100 mit

⁴Red/ET-Expressionssystem fördert die homologe Gen-Rekombination und wird durch Zugabe von L-Arabinose und Temperatur-Shift induziert. („Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Version 2.0 (January 2007)) von GENE BRIDGES)

4 Ergebnisse

LB-Medium mit Zugabe von Ampicillin und 1 mM L-Arabinose angeimpft und bei 30°C 2 h inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 1 h. Die Zellen wurden zu elektrokompenten Zellen präpariert. 800 ng Knockout-Konstrukt wurden nach dem Standardprotokoll für die Elektroporation in die SK46-Zellen transformiert und die Zellen wurden für eine weitere 3 h in 1 ml LB-Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf die LB-Platte mit Apramycin ausplattiert. Nach der homologen Rekombination wurden die Apramycin-resistenten Klone selektiert. Das Knockout-Konstrukt im Chromosom wurde mit zwei PCRs verifiziert (s. Abb. 4.5). Eine der positiv verifizierten Knockout-Kolonien wurde auf einer LB-Platte mit Apramycin ausplattiert und über Nacht wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde wieder eine Einzelkolonie ausgepickt und zur Kultivierung gebracht. Dieser Vorgang wurde noch dreimal wiederholt. Der resultierte *E. coli*-Stamm wurde als SK47-*E. coli* bezeichnet und für die Dauerkultur präpariert.

Thioredoxin und Thioredoxinreduktase in *S. tropica*

S. tropica ist ein grampositives Bakterium. Das Sequenzalignment und die Stammbaumanalyse zeigte auch deutlich, dass die beiden Arsenatreduktase-Domänen, vor allem die von Strop634, zu der Arsenatreduktase-Familie der grampositiven Bakterien passten. Für die typische Arsenatreduktase aus dieser Familie sind Thioredoxin und Thioredoxinreduktase an dem ganzen Reaktionszyklus beteiligt. Es wurde zuerst geplant, das eigene Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System aus *S. tropica* auszusuchen und im Anschluss das gefundene Trx/TrxR-System bei der Charakterisierung der Arsenatreduktase-Domänen einzusetzen.

Das ganze Genom von *S. tropica* wurde nach den möglich vorhandenen Thioredoxin- bzw. Thioredoxinreduktase-Genen durchsucht. Dazu wurden die Proteinsequenzen bekannter Thioredoxin und Thioredoxinreduktase aus *S. aureus* (SaTrxA (SAV1145) und SaTrxR (SAR0818)) zum BLAST angegeben. Zwei putative Thioredoxin-Gene (strop4580 und strop0730, deren Proteinsequenz auch später in dieser Arbeit als StTrx1, StTrx2 genannt) und ein putatives Thioredoxinreduktase-Gen (strop4579, dessen Proteinsequenz auch später in dieser Arbeit als StTrxR bezeichnet) wurden gefunden.

Beim Sequenzalignment zeigten StTrx1 und StTrx2 eine gewisse Ähnlichkeit (56 % ähnliche und 37 % identische Proteinsequenz). Wie bei den anderen Thioredoxinen haben sie hoch konservierte Proteinsequenz CGPC, die für die Elektronenübertragung verantwortlich sein kann (s. Abb. 4.6). Je nachdem ob die beiden Cysteingruppen als Einzel oder als Disulfidbindung im Protein vorliegen, wird das Thioredoxin als reduzierte oder oxidierte Form bezeichnet.

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

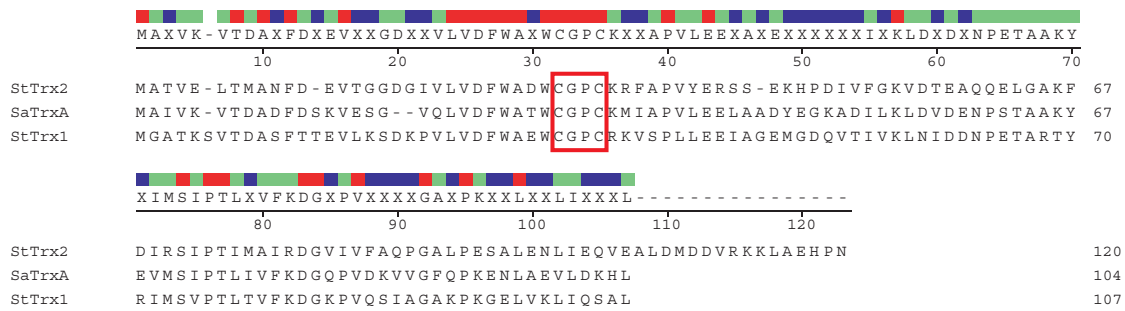


Abbildung 4.6: Sequenzalignment der putativen StTrx1 und StTrx2 mit einem bekannten Thioredoxin aus *S. aureus*. Umrandet ist die hoch konservierte Proteinsequenz CGPC für die Thioredoxine.

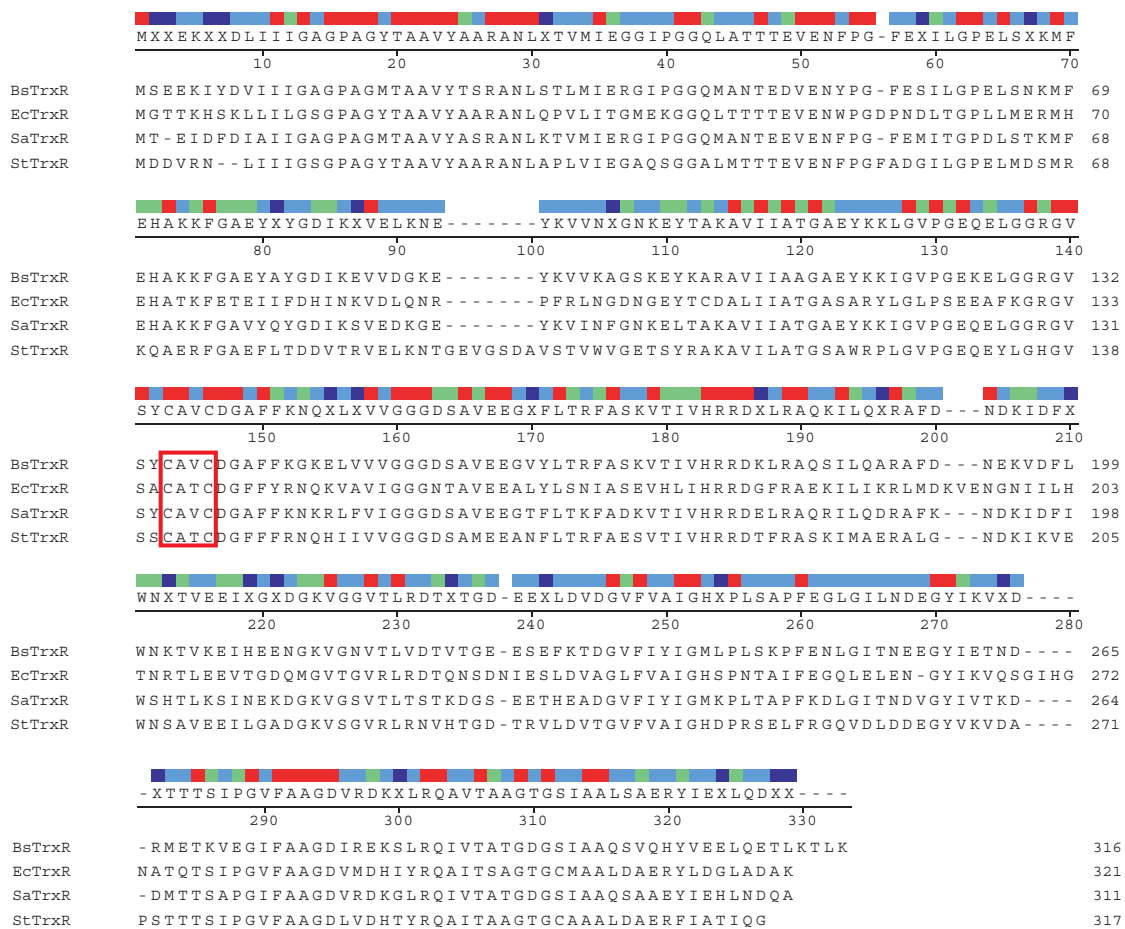


Abbildung 4.7: Sequenzalignment der putativen StTrxR mit drei bekannten Thioredoxinreduktasen aus *S. aureus*, *B. subtilis* und *E. coli*. Umrandet ist das Aktivzentrum bzw. Bindstelle für Thioredoxin und FAD bei der Reduktion.

4 Ergebnisse

Die putative StTrxR-Proteinsequenz wurde mit drei bekannten TrxR-Proteinsequenzen (EcTrxR, BsTrxR, SaTrxR) verglichen (s. Abb. 4.7). Es wurde gezeigt, dass StTrxR genau zu der TrxR-Familie der niedrigen Molekülmasse passt, was vor allem in Prokaryonten vorkommt [104]. Das putative Aktivzentrum besteht aus CATC in StTrxR und ist identisch zur EcTrxR, welche als Bindstelle für Thio-redoxin und FAD dienen kann [105].

Klonierung und Proteinexpression von StTrx1, StTrx2 und StTrxR Alle drei Gene wurden aus der genomischen DNA von *S. tropica* in einen *E. coli*-Expressionsvektor pTrc-10His-Xa subkloniert und nach dem Standardprotokoll in BL21-*E. coli* heterolog exprimiert. Die aufgereinigten Proteine zeigten auf dem SDS-PAGE-Gel die richtige Proteingröße jeweils bei 15 kDa, 15 kDa und 37 kDa (s. Abb. 4.8). Die gesamte Ausbeute für die drei Proteine lag zwischen 2-2,5 mg pro 125 ml Expressionskultur. Die aufgereinigten Proteinlösungen wurden anschließend in Tris-Puffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

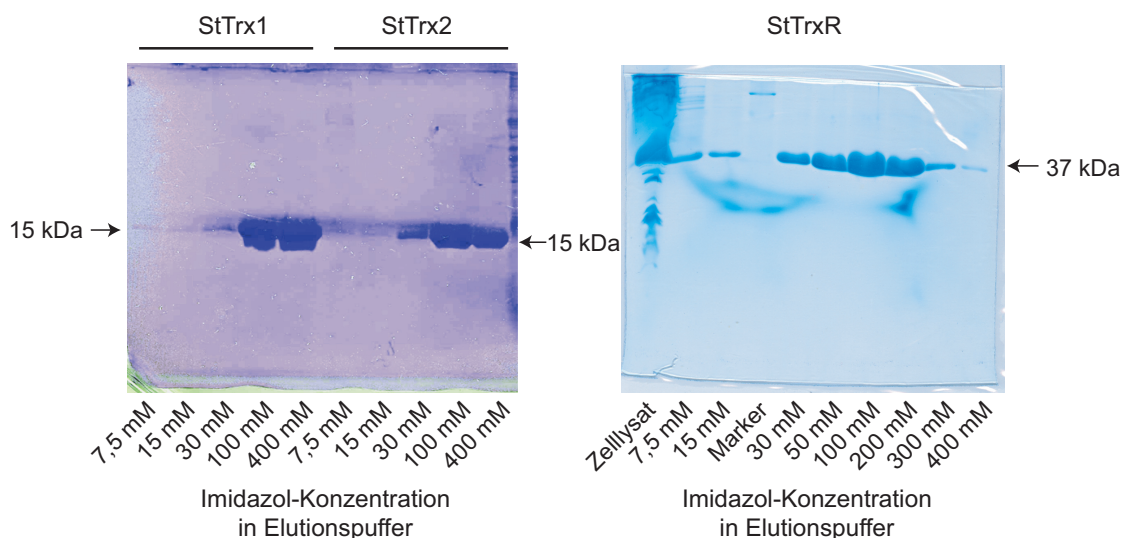


Abbildung 4.8: SDS-PAGE-Gel der heterologen Expression und Aufreinigung von StTrx1, StTrx2 und StTrxR. Angegeben sind die Imidazol-Konzentrationen in Elutionspuffer. Je 5 µl der Fraktionen wurden aufgetragen.

Enzymaktivitätsmessung des exprimierten StTrx/StTrxR-Systems Um das Vorhandensein der Aktivität vom exprimierten StTrx/StTrxR-System zu überprüfen, wurde eine Enzymaktivitätsmessung mittels eines künstlichen Substrats DTNB durchgeführt. Das durch StTrx/StTrxR-System katalysierte Produkt NTB

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt. Bei einem Vortest mit der Kombination von StTrx1/StTrxR und StTrx2/StTrxR (mit der gleichen Konzentration von StTrx1 und StTrx2 im Testansatz) wurden die ähnliche Reaktionskurven gezeigt (s. Abb. 4.9). Da StTrx1 (Strop4580) und StTrxR (Strop4579) sich in einem Gen-Cluster befinden, wurde das StTrx1/StTrxR-System für die weitere Charakterisierung des StTrx/StTrxR-Systems ausgewählt.

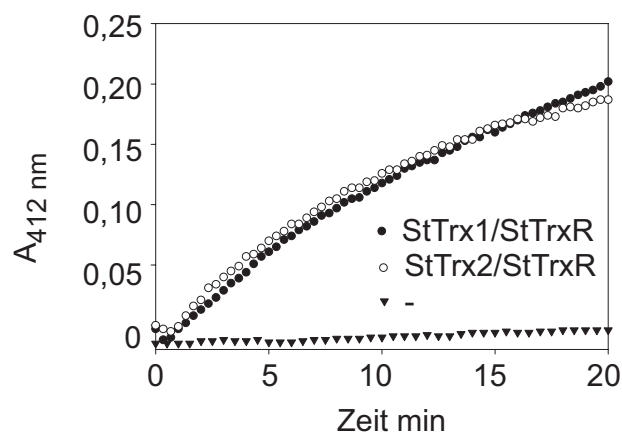


Abbildung 4.9: Aufnahme der Absorptionsänderung beim Trx/TrxR-Enzymassay. In 100 μ l Reaktionsansatz wurden 4 μ M StTrxR, 0,4 mM DTNB, 0,5 mM NADPH, 2 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0 und gleiche Trx-Konzentration (70 μ M StTrx1 bzw. StTrx2) eingesetzt. Eine Kontrollereaktion (ohne Trx/TrxR) wurde ebenfalls durchgeführt.

pH-Optimierung für StTrx/StTrxR-Enzymassay Die pH-Optimierung für den StTrx1/StTrxR-Enzymassay erfolgte mit der Bestimmung und dem Vergleich der Michaeliskonstante K_m und v_{max} bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 6,0, pH 8,0 und pH 10,0) im Testsystem, um einen optimalen pH-Wert für den späteren Einsatz des StTrx1/StTrx-Systems in Arsenatreduktase-Enzymassay zu schätzen. Bei pH 8,0 zeigte das StTrx1/StTrxR-System die höchste Aktivität mit K_m von 9,6 μ M und v_{max} von 0,011 min^{-1} , bei pH 6,0 war die Aktivität deutlich niedriger mit $K_m = 30,5 \mu\text{M}$ und $v_{max} = 0,008 \text{ min}^{-1}$). Bei pH 10,0 wurde keine messbare Aktivität gezeigt (s. Abb. 4.10).

Hemmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität durch Auranofin und Arsenit

Die Enzymaktivität von einigen Thioredoxinreduktasen kann durch Auranofin [106] und Arsenit [38] gehemmt werden. Auranofin ist eine organische Goldverbindung, vermutlich basiert der Hemmungseffekt auf der Interaktion von Gold mit

4 Ergebnisse

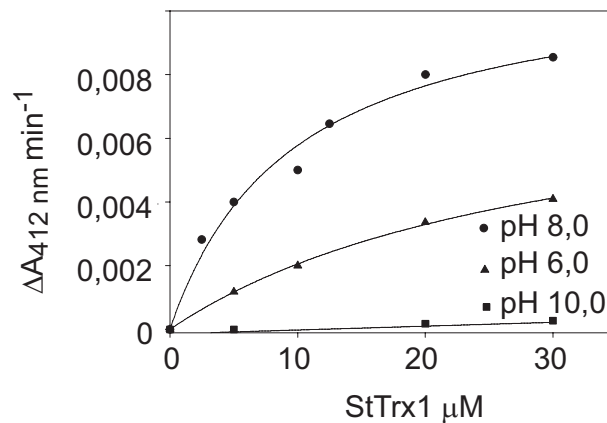


Abbildung 4.10: Aktivitätsbestimmung vom StTrx1/StTrxR-System bei unterschiedlichen pH-Werten. 100 μl Ansatz setzte sich aus 4 μM StTrxR, 0,4 mM DTNB, 0,5 mM NADPH, 2 mM EDTA, 100 mM Tris und unterschiedliche StTrx1-Konzentration (0-30 μM) bei pH 6,0, pH 8,0 und pH 10,0.

den SH-Gruppen von Thioredoxinreduktase. Arsenit kann ebenfalls aktiv mit SH-Gruppen der Thioredoxinreduktase reagieren, damit deren Enzymaktivität enorm beeinflusst werden kann. Hier wurde der Hemmungseffekt von den beiden Stoffen auf die Enzymaktivität von StTrxR getestet (s. Abb. 4.11). Das Ergebnis zeigte, dass StTrxR sehr leicht durch Auranofin gehemmt werden konnte ($\text{IC}_{50} = 5,2 \text{ nM}$). Die IC_{50} von Arsenit war auch relativ niedrig und lag bei 0,13 mM.

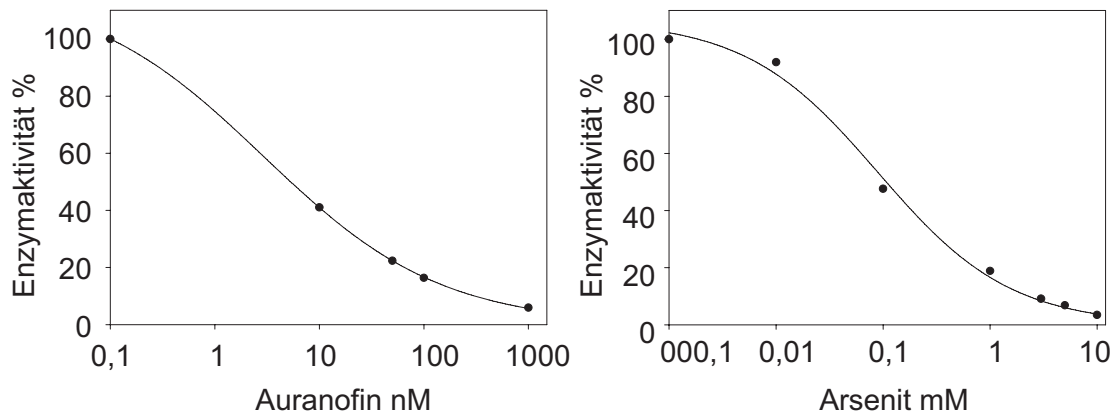


Abbildung 4.11: Konzentrationsabhängige Hemmung der StTrxR-Aktivität mittels Auranofin (links) und Arsenit (rechts). Die Aktivität wurde in 100 μl Ansatz (4 μM StTrxR, 0,4 mM DTNB, 0,5 mM NADPH, 2 mM EDTA, 70 μM StTrx1, 100 mM Tris, pH 8,0) mit Zugabe von Auranofin oder Arsenit bestimmt.

4.1.4 Charakterisierung der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Heterologe Expression und Aufreinigung der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Die beiden Arsenatreduktase-Domänen wurden zuerst aus den vorhandenen Konstrukten Strop634-ArsC-D-HA426 und Strop1447-ArsC-D-HA426 in einen *E. coli*-Expressionsvektor pQE30 umklontiert. Nach der Transformation in BL21(DE3)-pRep4 *E. coli*-Zelle wurden die Proteinexpression und der Zellaufschluss nach den Standardprotokollen durchgeführt. Die beiden löslichen Proteine (Strop634-ArsC-D und Strop1447-ArsC-D) wurden erfolgreich in *E. coli* exprimiert (s. Abb. 4.12). Nach einem weiteren Aufreinigungsprozess durch Ni^{2+} -NTA-Agarose konnte die Proteinkonzentration für die beiden Proteine bis zu 1,0-1,2 mg/ml in einer Elutionsfraktion (100 mM Imidazol) erreichen (s. Abb. 4.12). Die Ausbeute für die beiden Proteine lag zwischen 2-2,5 mg pro 125 ml Expressionskultur. Die aufgereinigten Proteinlösungen wurden anschließend in Tris-Puffer dialysiert und bei -20°C gelagert.

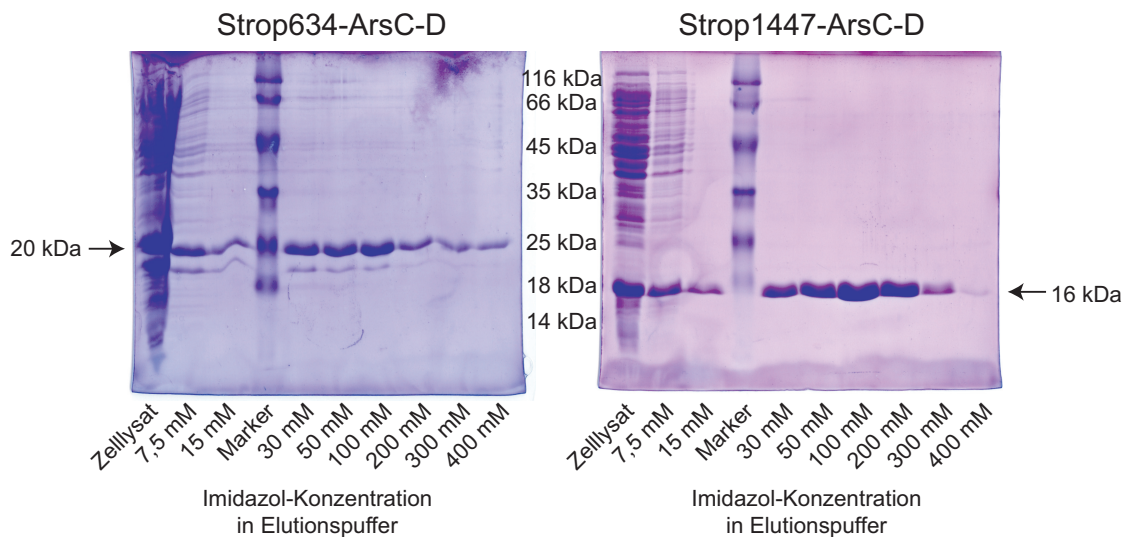


Abbildung 4.12: SDS-PAGE-Gel der heterologen Expression und Aufreinigung von den beiden Arsenatreduktase-Domänen. Angegeben sind Imidazol-Konzentrationen in Elutionspuffer. Je 5 μl der Fraktionen wurden aufgetragen.

Enzymaktivitätsmessung der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Zuerst wurden die beiden exprimierten Arsenatreduktasen jeweils mit dem selbst exprimierten StTrx1/StTrxR-System beim Arsenatreduktase-Enzymassay eingesetzt. Es wurde keine erkennbare Arsenatreduktase-Aktivität von den beiden gefunden. Im Anschluss wurde versucht, ein erworbenes EcTrx/EcTrxR-System aus *E. coli* das StTrx1/StTrxR-System im Enzymassay zu ersetzen. Nach der Konzentrationsoptimierung wurde die Enzymaktivität von Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 *in vitro* nachgewiesen und bestimmt ($K_m = 75 \text{ mM}$, $k_{cat} = 13 \text{ min}^{-1}$), bei der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 wurde keine Reduktase-Aktivität in diesem Assay gezeigt (s. Abb. 4.13).

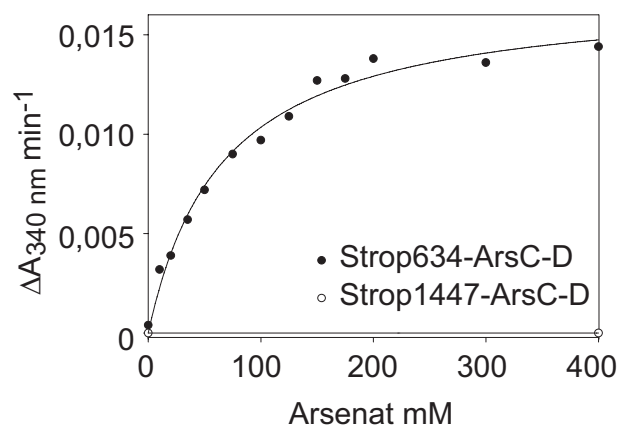


Abbildung 4.13: Enzymaktivitätsbestimmung der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447. In 100 μl Ansatz wurden 0,25 μM Arsenatreduktase, 6,72 μM EcTrx, 0,345 μM EcTrxR, 125 μM NADPH, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 und verschiedene Konzentrationen von Substrat Arsenat (0-400 mM) eingesetzt. Der Verbrauch von NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Hemmung der Arsenatreduktase-Aktivität von Strop634 durch Arsenit

Es ist bekannt, dass einige Arsenatreduktasen durch ihr Enzymprodukt Arsenit gehemmt werden können [63, 107]. Hier wurde die Hemmung der Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 durch ihr Enzymprodukt Arsenit getestet (s. Abb. 4.14). Der Hemmungseffekt war deutlich zu erkennen, wenn Arsenit zum Reaktionsansatz zugegeben wurde. Es ergab sich eine IC_{50} von 1,8 mM.

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

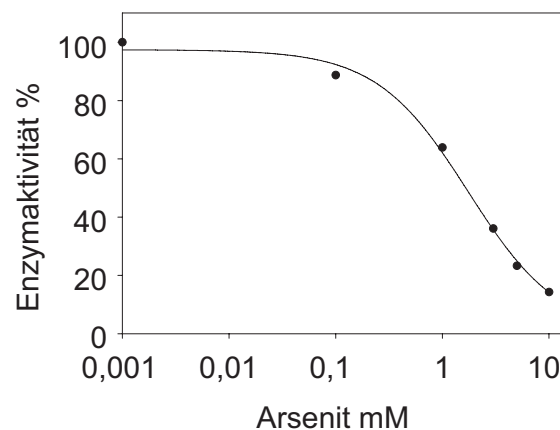


Abbildung 4.14: Hemmung der Arsenatreduktase-Aktivität von Strop634-ArsC-D durch Arsenit. In 100 μ l Ansatz wurden 0,25 μ M Arsenatreduktase, 6,72 μ M EcTrx, 0,345 μ M EcTrxR, 125 μ M NADPH, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 400 mM Arsenat und verschiedene Zugaben von Arsenit (0-10 mM) eingesetzt. Der Verbrauch von NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Einige Arsenatreduktasen zeigen bei ihrem Sequenzvergleich große Ähnlichkeit zu den Phosphatase-Familien, z. B. SaArsC und LMW-PTPase [62], ScArsC und CDC25-Phosphatase [65]. Die Phosphatase-Aktivität von einigen Arsenatreduktasen wurde ebenfalls bereits experimentell bestätigt [62, 67, 108, 109, 110, 111].

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zur LMW-PTPase vor allem eines hoch konservierten C-X_n-R-Anion-Bindungsmotiv (s. Abb. 4.15) bei der Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 wurde auch eine Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität erwartet. Bei der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 fehlt jedoch diese wichtige Sequenz (s. Abb. 4.15). Zur Enzymaktivitätsbestimmung wurde standardmäßig ein künstliches Substrat 4-Nitrophenylphosphat (pNPP) eingesetzt.

Die Phosphatase-Aktivität wurde bei Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 mit $K_m = 6,3$ mM und $k_{cat} = 0,016 \text{ min}^{-1}$ nachgewiesen. Bei Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 wurde keine Phosphatase-Aktivität gezeigt (s. Abb. 4.15)

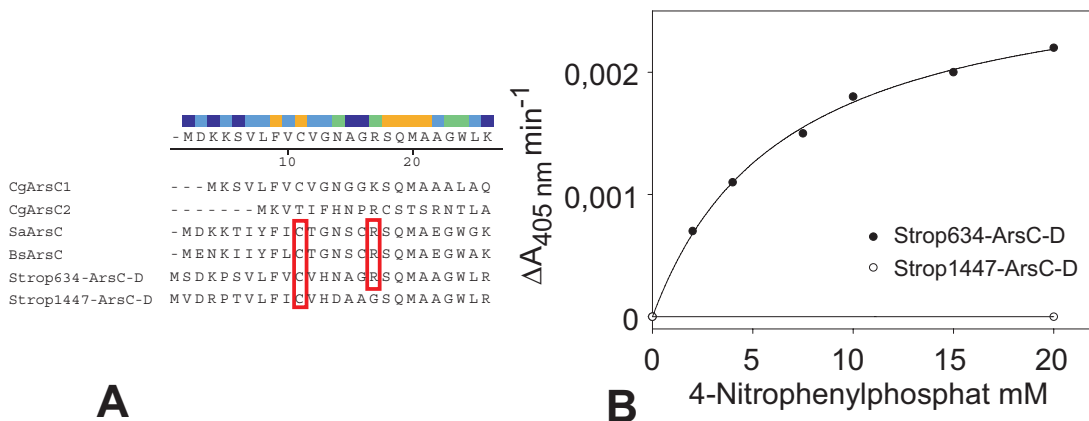


Abbildung 4.15: A: Sequenzvergleich des Anion-Bindungsmotives von verschiedenen Arsenatreduktasen aus grampositiven Bakterien. Umrandet sind die Bindungsmotive C-X_n-R für die Phosphotyrosinphosphatase. Bei Strop1447-ArsC-D ist das fehlende Arginin zu sehen. (Alignment durchgeführt mit Clustal W-Methode) **B:** Phosphatase-Aktivität der Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447.

4.1.5 Charakterisierung der Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447

In der vorherigen Diplomarbeit wurde die Arsenit-Leitfähigkeit sowohl bei dem Fusionsprotein Strop634 als auch bei der Aquaporin-Domäne von Strop634 in He-fzellen phänotypisch nachgewiesen (s. Abb. 4.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Solut-Leitfähigkeit durch die beiden Fusionsproteine bzw. ihre Aquaporin-Domänen in weiteren verschiedenen Testsystemen charakterisiert.

Phänotypische Untersuchung der Antimonit-Leitfähigkeit durch Aquaglyceroporine SK47-Zellen

Antimonit (Antimontrioxid) ist ein Arsenit-Analogon, das ähnliche chemische und strukturelle Eigenschaften zu Arsenit bzw. Glycerol aufweist. Der pK_a-Wert von Antimonit liegt bei 11,8, damit liegt es wie Arsenit hauptsächlich in der Natur als ungeladene Form Sb(OH)₃ vor [54]. Das molare Volumen von Antimonit (62 cm³/mol) ist ein bisschen größer als Arsenit (59 cm³/mol) aber kleiner als Glycerol (71 cm³/mol) [71]. Es wurde vermutet, dass das Antimonit wegen seiner Größe leichter als Glycerol durch den Kanal von Aquaglyceroporinen passieren kann [112].

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

Die bisher bekannten Arsenit-leitenden Aquaglyceroporine (EcGlpF, ScFps1, hAQP7 und hAQP9) zeigen ebenfalls Antimonit-Leitfähigkeit [8, 44, 72, 112]. Hier wurde die Antimonit-Leitfähigkeit der beiden Aquaporin-Domänen von Strop634 und Strop1447 phänotypisch in SK47 *E. coli*-Zellen untersucht.

Bei den SK47 *E. coli*-Zellen wurden das endogene Aquaglyceroporin-Gen für das Arsenit-leitende EcGlpF und das für die Antimonit-Ausscheidung zuständige *arsB*-Gen [54] deletiert. Daher ist dieser *E. coli*-Stamm Antimonit-unempfindlich. Wenn aber ein funktionelles Antimonit-leitendes Aquaglyceroporin in diesem *E. coli*-Stamm beim Antimonit-haltigen Testmedium exprimiert ist, kann eine Toxizitätserscheinung (ein abgeschwächtes Wachstum) wegen des Antimoniteinstroms gezeigt werden.

Zum Assay wurden die beiden Aquaporin-Domänen in einen *E. coli*-Expressionsvektor pQE30 ligiert und anschließend in SK47-Zellen durch Elektroporation transformiert. Als Kontrolle dienten jeweils mit EcGlpF-pQE30 (Positivkontrolle) und Leerplasmid pQE30 (Negativkontrolle) transformierte SK47-Zellen sowie SK46-Zellen. Auf den Antimonit-haltigen Platten zeigte es deutlich, dass die Zellen sowohl mit der Positivkontrolle als auch mit der Aquaporin-Domäne von Strop634 ein vermindertes Wachstum aufwiesen (s. Abb. 4.16). Das toxische Antimonit konnte daher über die beiden Aquaglyceroporine in die Zellen nach dem chemischen Gradienten eindringen. Die anderen Zellen waren aufgrund der fehlenden Antimonit-leitenden Aquaglyceroporine Antimonit-unempfindlich.

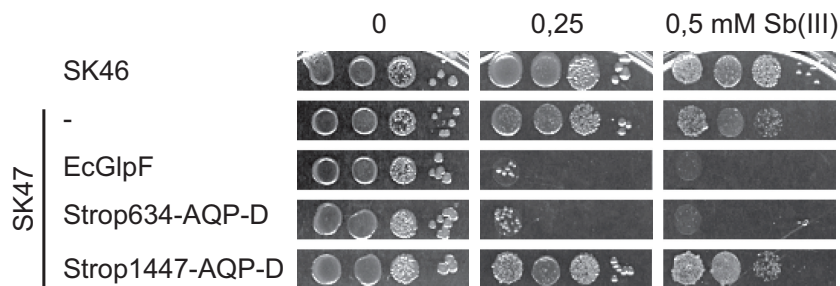


Abbildung 4.16: Antimonit-Aufnahme-Assay in Antimonit-unempfindlichen SK47 *E. coli*-Zellen. Getestet wurde die beiden Aquaporin-Domänen (Strop634-AQP-D und Strop1447-AQP-D). Das abgeschwächte Wachstum von SK47-Zellen wies auf eine Antimonit-Leitfähigkeit von den Aquaglyceroporinen hin.

Direkter Arsenit-Aufnahme-Assay in Hefezellen

Um eine direkte Arsenit-Aufnahme durch die Aquaglyceroporine zu untersuchen, wurden die jeweils mit den beiden Fusionsgenen (*strop634* und *strop1447*), sowie

4 Ergebnisse

ScFps1 (Positivkontrolle) und Leerplasmid (Negativkontrolle) transformierten Hefezellen des Stammes BY4742 Δ fps1 Δ acr2,3 Δ ycf1 in einem 1 mM Arsenit-haltigen flüssigen Medium unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Menge des aufgenommenen Arsenit im Zytosol⁵ gegen die Zeit wurde durch ein Atomabsorptionsspektrometer mit Hydrid-Atomisierungstechnik quantitativ bestimmt.

Die Aufnahmekurven entsprachen dem phänotypischen Wachstumsassay. Strop634 zeigte eine ähnliche Arsenit-Leitfähigkeit wie die Positivkontrolle ScFps1 (s. Abb. 4.17). Bei Strop1447 war die Aufnahmekurve fast identisch mit der Negativkontrolle, was auf die fehlende Arsenit-Leitfähigkeit hinwies.

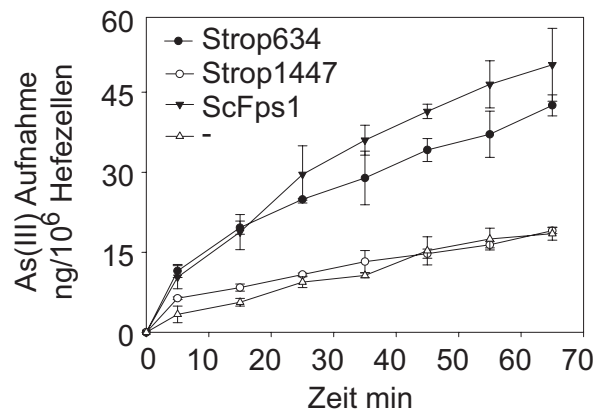


Abbildung 4.17: Direkter Arsenit-Aufnahme-Assay von Strop634, Strop1447 sowie Positivkontrolle ScFps1 und Negativkontrolle in Δ fps1 Δ acr2,3 Δ ycf1-Hefezellen. Aufgetragen sind die aufgenommenen Arsenit-Mengen in ng pro 10^6 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Werte stammten aus drei unabhängigen Probenvorbereitungen und Messungen. Die Standardfehler der Mittelwerte sind ebenfalls angegeben ($n = 3$).

Glycerol-Stress-Assay

Der Glycerol-Stress-Assay dient zur ersten Einschätzung der Glycerol-Leitfähigkeit der Aquaglyceroporine. Das Experiment wurde von Dr. Binghua Wu durchgeführt. Die zu untersuchenden Hefezellen wurden vorher in einem Glycerol-haltigen Medium (SD HLK + 1 M Glycerol) über Nacht inkubiert, dadurch wurde ihr Zytosol mit Glycerol beladen. Mit den funktionellen Glycerol-leitenden Aquaglyceroporinen z. B. PfAQP sollte es bei einer hypoosmotischen Testbedingung (SD HLK-Platte) zu einem normalen Hefewachstum führen (s. Abb. 4.18), da die Hefezellen durch

⁵Die Zellzahl wurde durch eine Zählkammer ausgezählt und ergab sich der Wert: $1 \text{ OD}_{600} = 1,25 \times 10^6$ Hefezellen/ml.

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

die Ausscheidung von Glycerol diesen osmotischen Stress kompensieren konnten. Die Hefezellen ohne funktionelle Glycerol-leitende Aquaglyceroporine waren nicht in der Lage, diesen osmotischen Stress auszugleichen und es führte zu einem abgeschwächten Wachstum, wie die Negativkontrolle in Abbildung 4.18 zeigte. Unter der isoosmotischen Testbedingung (SD HLK-Platten + 1 M Sorbitol) sollten genau umgekehrte Erscheinungen gezeigt werden. Ein vermindertes Wachstum deutete auf die funktionellen Aquaglyceroporine z. B. PfAQP hin, da für sie ein osmotischer Druck wegen des Verlusts von Glycerol entstand. Ein normales Wachstum war bei den Hefezellen ohne funktionelle Aquaglyceroporine aufgrund des unveränderten Zellinnendrucks zu sehen. Bei Strop634 und Strop1447 zeigten sowohl die Fusionsproteine als auch die jeweiligen Aquaporin-Domänen bei diesem Assay keine deutlichen Unterschiede zur Negativkontrolle, was auf die fehlende (nicht detektierbare) Glycerol-Leitfähigkeit von Strop634 und Strop1447 hinwies.

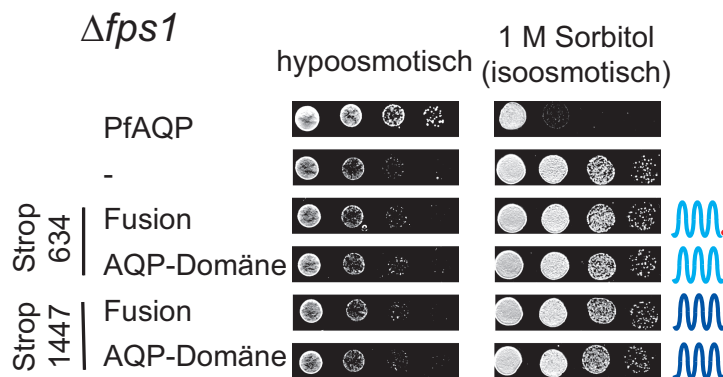


Abbildung 4.18: Glycerol-Stress-Assay von Strop634, Strop1447 und deren Aquaporin-Domänen sowie Positivkontrolle PfAQP und Negativkontrolle in $\Delta fps1$ -Hefezellen

Direkte Glycerol-Leitfähigkeitsmessung in Protoplasten mit der Stopped-Flow-Apparatur

Zur direkten Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit sowie Wasser-Leitfähigkeit von Strop634 und Strop1447 wurde in dieser Arbeit eine Protoplasten-basierte dynamische Lichtstreuungsmessung mittels einer Stopped-Flow-Apparatur durchgeführt. Nach der Protoplasten-Präparation von jeweils mit strop634, strop1447 sowie einer Positivkontrolle PfAQP und einer Negativkontrolle (Leerplasmid) transformierten Hefezellen in einem Saccharose-basierten Puffersystem wurden die Protoplasten (1,2 M Saccharose) mit einem Testpuffer (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 gemischt, damit entstanden gleichzeitig ein auswärts gerichteter osmotischer (300 mOsm/l) Gradient und ein einwärts

4 Ergebnisse

gerichteter chemischer (300 mM) Gradient von Glycerol. Ein Glycerol-leitendes Aquaglyceroporin z. B. PfAQP hier zeigte eine typische zweiphasige Kurve (s. Abb. 4.19), was zuerst dem Wasserausstrom und anschließend dem Glyceroleinstrom entsprach. Hier waren die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP fünffach größer als die Negativkontrolle (Wasserdiffusion). Übrigens war die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP auch deutlich zu erkennen, während die Negativkontrolle wegen des fehlenden Aquaglyceroporins keine Glycerol-Leitfähigkeit aufwies. Die Messkurve von Strop634 zeigte einen ähnlichen Verlauf wie PfAQP, allerdings waren sowohl die Wasser-Leitfähigkeit ($55 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu $113 \mu\text{m/s}$ von PfAQP) als auch die Glycerol-Leitfähigkeit ($0,01 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu $0,1 \mu\text{m/s}$ von PfAQP) deutlich schwächer als die Positivkontrolle. Bei Strop1447 waren weder die Wasser-Leitfähigkeit noch Glycerol-Leitfähigkeit hier zu beobachten.

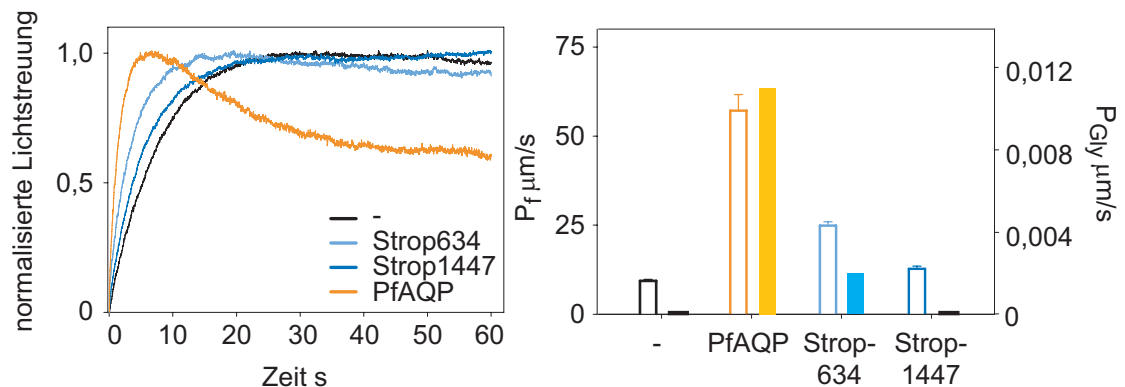


Abbildung 4.19: Dynamische Lichtstreuungsmessung von Strop634 und Strop1447 im Vergleich zu PfAQP (Positivkontrolle) und Leerplasmid (Negativkontroll) (links). Graphische Darstellung und Vergleich der ermittelten Koeffizienten von Wasser-Leitfähigkeit P_f und Glycerol-Leitfähigkeit P_{Gly} (rechts). Weiß gefüllte Balken sind die Koeffizienten von Wasser-Leitfähigkeit und die Koeffizienten von Glycerol-Leitfähigkeit wurden mit Farbe gefüllte Balken dargestellt. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben ($n = 7-10$).

4.1.6 Charakterisierung der fusionierten Form von Strop634 und Strop1447

Phänotypische Untersuchung der Kreuz kombinierten Strop634 und Strop1447 in Hefezellen

In der vorherigen Diplomarbeit wurden die beide Strop634 und Strop1447 als native Proteine auf ihre Aquaporin- und Arsenatreduktase-Funktionalität phäno-

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

typisch in Hefezellen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei modifizierte Konstruktionen für Strop634 und Strop1447 hergestellt, nämlich Strop634-AQP-D-Strop1447-ArsC-D und Strop1447-AQP-D-Strop634-ArsC-D. Diese Konstruktionen mit dem Domäne-Austausch und zusammen mit den beiden nativen Fusionsproteinen wurden in einem Arsenat-hypersensitiven Hefestamm By4742- Δ fps1 Δ acr2,3 Δ ycf1, dessen ABC-Transporter Ycf1 für die Arsenit-Akkumulation in Vakuole zusätzlich noch deletiert ist. Dieser phänotypische Assay zeigte, dass das Vorhandensein von den beiden Domänen von Strop634 in den Hefezellen für die Arsenat-Resistenz notwendig war. Die Kombination von Aquaporin-Domäne und Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 in der nativen Form trug das ganz Prozess für die Arsenat-Detoxifikation bei. Bei Strop1447 wurden wie immer keine Funktionalitäten sowohl von Arsenatreduktase-Domäne als auch von Aquaporin-Domäne phänotypisch in Hefezellen nachgewiesen (s. Abb. 4.20).

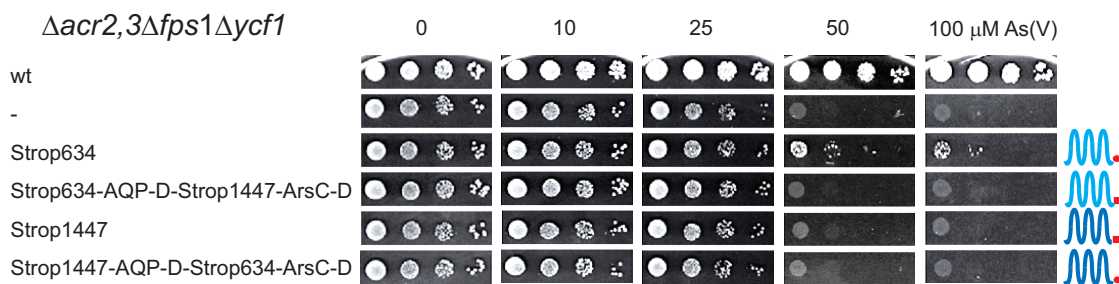


Abbildung 4.20: Arsenat-Resistenz-Assay von den nativen Strop634 und Strop1447 sowie den Konstruktionen mit den ausgetauschten Domänen in Hefestamm By4742- Δ fps1 Δ acr2,3 Δ ycf1. Das Wachstum von den Hefezellen auf den Arsenat-haltigen Platten deutete auf einen kompletten Arsenat-Detoxifikationsmechanismus in Hefezellen hin.

Phänotypische Untersuchung der Strop634 und Strop1447 in SK47 *E. coli*-Zellen

Der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *E. coli*-Stamm SK47 ist wegen des fehlenden ars-Operons hoch Arsenat-sensitiv. Um eine phänotypische Untersuchung der fusionierten Strop634 und Strop1447 in *E. coli* zu ermöglichen, wurden die beiden Fusionsgene in einen *E. coli*-Expressionsvektor pQE30 umkloniert und anschließend in SK47-Zellen durch Elektroporation transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf den Arsenat-haltigen LB-Platten mit einer IPTG-Zugabe (40 µl, 100 mM IPTG) für die Induktion getestet (s. Abb. 4.21). Strop634 konnte zum Teil die fehlende ars-Operon-Funktion in SK47-Zellen im Vergleich mit SK46-Zellen übernehmen und daher überlebten die Zellen. Bei Strop1447 wurde ähnlich

4 Ergebnisse

wie Negativkontrolle kein Wachstum von den transformierten *E. coli*-Zellen auf den Arsenat-haltigen Platten (ab 0,5 mM As(V)) gezeigt.

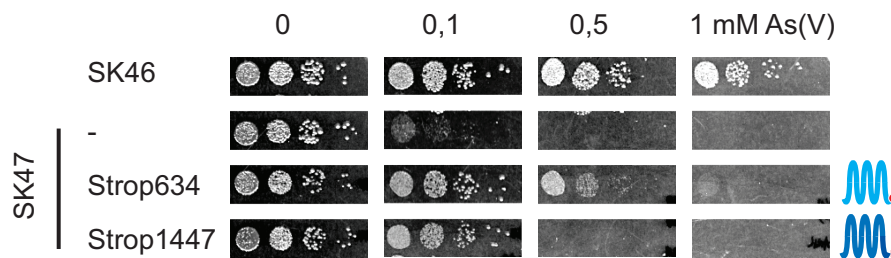


Abbildung 4.21: Arsenat-Resistenz-Assay von Strop634 und Strop1447 in SK47 *E. coli*-Zellen. Das Wachstum von *E. coli*-Zellen auf den Arsenat-haltigen Platten deutete auf einen kompletten Arsenat-Detoxifikationsmechanismus in *E. coli*-Zellen hin.

4.1.7 Charakterisierung der Strop634 und Strop1447 in *S. tropica*

Bisher wurden die Arsenit-leitende Aquaporin-Funktion und Arsenatreduktase-Funktion nur bei Strop634 nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass es sich bei Strop1447 sich ausschließlich um ein Pseudogen handelt. Es ist erforderlich, die beiden Gene direkt in *S. tropica* zu charakterisieren.

Herstellung und Affinitätsaufreinigung von Antikörpern gegen Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447

Herstellung der Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 Um direkt zu überprüfen, ob die beiden Gene für Strop634 und Strop1447 tatsächlich in *S. tropica* (als fusionierte Form) exprimiert sind, wurde die Herstellung zweier polyklonaler Antikörperseren gegen die jeweilige Arsenatreduktase-Domäne in Auftrag gegeben. Die beiden heterolog exprimierten und aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 wurden als Antigene jeweils in zwei Kaninchen (Kaninchen 3831, 3832 für Strop634 und Kaninchen 3833, 3834 für Strop1447) injiziert. Vier Serenproben pro Kaninchen wurden entnommen (jeweils 1., 35., 63., 91. Tag nach der Immunisierung). Zuerst wurden acht gelieferte Antikörperseren (1. und 91. Tag nach der Immunisierung vom jeweiligen Kaninchen) auf das Vorhandensein der Antikörper gegen die entsprechenden Arsenatreduktase-Domänen mittels Dot Blot getestet (s. Abb. 4.22).

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

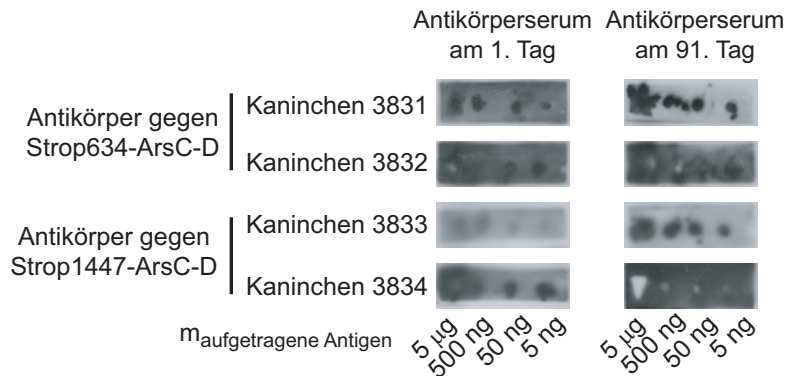


Abbildung 4.22: Kontrolle der gelieferten Antikörperseren mit Dot Blot. Die aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 (5 µg und eine weitere Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000)) wurden jeweils auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Die entsprechenden Antikörperseren (gewonnen am 1. und 91. Tag nach der Immunisierung) wurden in einer Verdünnung von 1:500 in M-TBS-T als Primärantikörper eingesetzt. Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen (0,4 mg/ml)) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt.

Alle Antikörperseren (1. und 91. Tag) konnten die entsprechenden Arsenatreduktase-Domänen detektieren, wobei wurde es zuerst erwartet, dass die Antikörperseren vom 1. Tag keine Signale liefern sollten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Antikörperseren auch unspezifische Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domänen enthielten. Alle Antikörperseren am 91. Tag lieferten aber auch deutlich stärkere Signale als die am 1. Tag, was das Vorhandensein der Antikörper gegen die entsprechenden Arsenatreduktase-Domänen in allen Seren bedeutete. Ein weiterer Aufreinigungsprozess ist allerdings erforderlich, um die Spezifität zu erhöhen. Im Folgenden wurden die Seren aus Kaninchen 3831 und 3833 für die Herstellung der Antikörper gegen die Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 weitergearbeitet, da sie im Dot Blot relativ schwache Signale bei den Antikörperseren am 1. Tag erzeugten und wahrscheinlich wenige unspezifische Antikörper enthielten.

Affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörperseren mit SulfoLink® Immobilization Trail Kit Um die in Seren vorhandenen unspezifischen Antikörper zu entfernen, wurden die Antikörperseren mit SulfoLink® Kit affinitätschromatographisch aufgereinigt.

- Kopplung der Arsenatreduktase-Domänen an die Säule
Zuerst wurden die beiden aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 jeweils auf zwei SulfoLink® Coupling Gel immo-

bilisiert. Die beiden Arsenatreduktase-Domänen haben jeweils drei bzw. ein Cystein(e) in ihrer Proteinsequenz, welche(s) sich kovalent an Thiolgruppen der aktivierten Matrix binden kann(können). Um die Kopplungseffizienz der Immobilisierung des Antigens abschätzen zu können, wurde die Proteinkonzentration der Antigen-Lösung vor und nach der Kopplungsreaktion mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt (s. Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: Quantifizierung der Kopplungseffizienz der Antigene bei SulfoLink®

	Antigen-Lösung Strop634-ArsC-D	Antigen-Lösung Strop1447-ArsC-D
C _{Ausgangslösung}	3,47 mg/ml	4,21 mg/ml
V _{Ausgangslösung}	0,15 ml	0,21 ml
m _{Ausgangslösung}	520 µg	884 µg
V _{DurchlaufLösung 1}	2,5 ml	2,5 ml
C _{DurchlaufLösung 1}	112,2 µg/ml	23,3 µg/ml
m _{DurchlaufLösung 1}	280,5 µg	58,1 µg
V _{DurchlaufLösung 2}	8 ml	8 ml
C _{DurchlaufLösung 2}	16,4 µg/ml	40,2 µg/ml
m _{DurchlaufLösung 2}	131,2 µg	321,6 µg
m _{gesamt in DurchlaufLösung}	411,7 µg	379,7 µg
m _{gebundene Protein}	108,3 µg	504,3 µg
Kopplungseffizienz	20,9 %	57,0 %

- Kopplung der polyklonalen Antikörper an die immobilisierten Arsenatreduktase-Domänen
Die Affinitätskopplung der polyklonalen Antikörper in Seren an die immobilisierten Antigene wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die beiden Matrices mehrfach mit Waschpuffer gewaschen. Die Proteinkonzentration in Durchlaufösungen wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Matrices wurden so lang gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm von den Durchlaufösungen unter 0,005 lag.
- Elution der Antikörper aus den Matrices
Die mit den Antigenen gebundenen Antikörper wurden pH-abhängig eluiert. Die Proteinkonzentration drei eluierter Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm miteinander verglichen und die genaue Konzentration wurde mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt (s. Tab 4.5). Die eluierte Fraktion 3 für die jeweilige Antikörperlösung zeigte die größte Absorption bei 280 nm und höchste Proteinkonzentration.

Zur Kontrolle der aufgereinigten Antikörper wurden alle drei Fraktionen für

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

Tabelle 4.5: Vergleich der Proteinkonzentration in Eluat

	Antikörper für Strop634-ArsC-D			Antikörper für Strop1447-ArsC-D		
	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3
A ₂₈₀	0,246	0,446	0,564	0,226	0,398	0,492
c mg/ml	1,24	1,34	1,50	0,77	1,13	1,46

die entsprechenden Antigene zu einem Dot Blot eingesetzt (s. Abb. 4.23). Alle Fraktionen konnten die entsprechenden Antigene detektieren, wobei die beiden Fraktion 3 mit der höchsten Proteinkonzentration die beste Antigenerkennung aufwiesen. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration (Antikörperkonzentration) und der besseren Antigenerkennung wurden die beiden Fraktion 3 als Antikörper gegen die jeweilige Arsenatreduktase-Domäne ausgewählt.

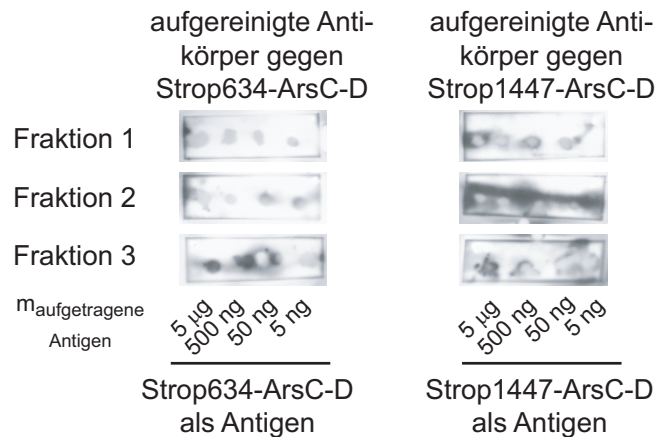


Abbildung 4.23: Kontrolle der aufgereinigten Antikörper mit Dot Blot. Die aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 (5 µg und eine weitere Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000)) wurden jeweils auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Die aufgereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 in M-TBS-T als Primärantikörper eingesetzt. Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen (0,4 mg/ml)) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt.

Testung der aufgereinigten Antikörper Die beiden Arsenatreduktase-Domänen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf und können daher möglicherweise mit den aufgereinigten Antikörpern Kreuzreaktivität zeigen. Um zu überprüfen, ob die beiden aufgereinigten Antikörper eine ausreichende Spezifität hatten, wurde ein gekreuzter Dot Blot durchgeführt, nämlich die Bindungsaffinität vom aufgereinigten An-

4 Ergebnisse

Antikörper ursprünglich gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 wurde mit Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 getestet und beim Test mit dem Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 war genau umgekehrt. In Abbildung 4.24 wurde gezeigt, dass die Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 auch unspezifisch mit Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 reagieren konnte. Die Spezifität beim Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 war allerdings vorhanden.

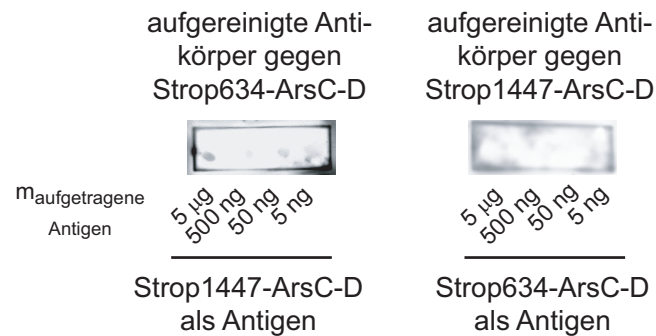


Abbildung 4.24: Kontrolle der Spezifität der aufgereinigten Antikörper mit Dot Blot. Die aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 (5 µg und eine weitere Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000)) wurden jeweils auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Die aufgereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 in M-TBS-T als Primärantikörper gekreuzt mit Antigenen eingesetzt. Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen (0,4 mg/ml)) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt.

Affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörperseren mit NHS HP Spin Trap™ Wegen der nicht ausreichenden Spezifität wurde es versucht, den Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 in Antikörperseren noch einmal mit NHS HP SpinTrap™ aufzureinigen. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Drei Fraktionen wurden eluiert. Die Konzentration und Reinheit von drei Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE abgeschätzt (s. Abb. 4.25). Zur Testung der aufgereinigten Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 wurde die Fraktion 3 ausgewählt aufgrund ihrer hohen Proteinkonzentration. Um die Bindungsaffinität und Spezifität zu überprüfen, wurden ein normaler Dot Blot mit der Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 und ein gekreuzter Dot Blot mit der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 durchgeführt. Eine zufriedenstellende Spezifität vom Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 wurde gezeigt und dieser Antikörper wurde später zur Immundetektion eingesetzt.

4.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

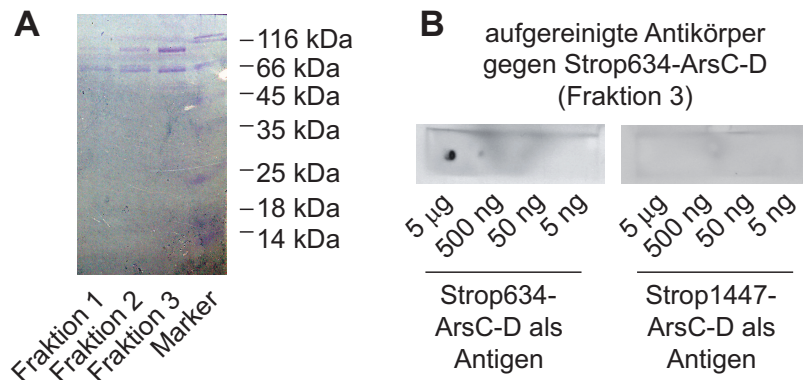


Abbildung 4.25: **A:** SDS-PAGE von der aufgereinigten Antikörper Fraktion 1 bis 3. Die gezeigten Banden sind typisch Fab-Fragment (ca. 60 kDa) und F(ab)₂-Fragment (ca. 110 kDa) für IgG. Die Fraktion 3 zeigte die hohe Reinheit und die höchste Proteinkonzentration. **B:** Dot Blot und gekreuzter Dot Blot mit dem aufgereinigten Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634. Die aufgereinigten Arsenatreduktase-Domänen von Strop634 und Strop1447 (5 µg und eine weitere Verdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000)) wurden jeweils auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Der aufgereinigte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in M-TBS-T als Primärantikörper mit beiden Antigenen getestet. Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen (0,4 mg/ml)) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt.

Überprüfung der Expression von Fusionsproteinen Strop634 und Strop1447 in *S. tropica* mittels der aufgereinigten Antikörper

Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. tropica* Die Isolierung der mikrosomalen Fraktion von *S. tropica* wurde zuerst nach dem Standardprotokoll für *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert. Nach der Coomassie-Färbung wurden schmierende Banden auf dem SDS-PAGE-Gel gezeigt, die nicht für den Western Blot geeignet waren (s. Abb. 4.26). Ein weiterer Aufreinigungsprozess durch TCA-Fällung für die Proben wurde durchgeführt. Eine verbesserte Bandentrennung wurde durch SDS-PAGE bestätigt (s. Abb. 4.26), vermutlich wurden störende Farbstoffe oder andere Komponenten in der mikrosomalen Fraktion durch TCA-Fällung entfernt.

Expressionskontrolle der nativen Fusionsproteinen Strop634 und Strop1447 in *S. tropica* mittels der aufgereinigten Antikörper Die isolierte und aufgereinigte mikrosomale Fraktion von *S. tropica* wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss mittels der aufgereinigten Antikörper für die jeweilige Arsenatreduktase-

4 Ergebnisse

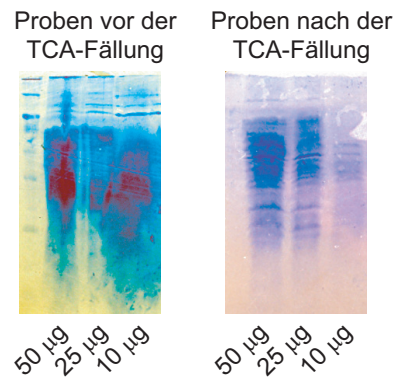


Abbildung 4.26: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel mit den Proben vor (links) und nach (rechts) der TCA-Fällung. Ca. 50 µg, 25 µg und 10 µg Gesamtprotein in Proben wurden pro Spur aufgetragen.

Domäne im Western Blot auf das Vorhandensein der beiden nativen Fusionsproteine analysiert (s. Abb. 4.27). Die beiden Fusionsproteine Strop634 und Strop1447 wurden in der mikrosomalen Fraktion durch Western Blot detektiert. Eine vollständige Expression von den beiden nativen Fusionsproteinen wurde jeweils mit der Proteingröße von 47 kDa und 42 kDa nachgewiesen.

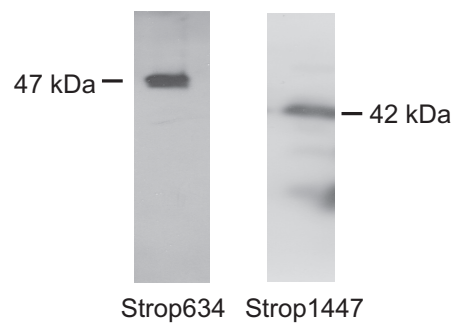


Abbildung 4.27: Western Blot der mikrosomalen Fraktion von *S. tropica* jeweils mit Antikörper gegen Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 und Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447. Pro Spur wurden 40 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der primäre Antikörper wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 in M-TBS-T eingesetzt. Der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen (0,4 mg/ml)) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in M-TBS-T eingesetzt.

Phänotypische Untersuchung der Strop634 und Strop1447 in *S. tropica* durch verschiedene Knockout-Stämme von *S. tropica*

Die Knockout-Stämme und phänotypische Untersuchung wurden von Dr. Binghua Wu hergestellt und durchgeführt. Bisher wurde die Funktionalität von Strop634 (Aquaporin-Domäne und Arsenatreduktase-Domäne) sowohl *in vivo* (*S. cerevisiae* und *E. coli*) als auch *in vitro* nachgewiesen. Strop1447 zeigte aber weder Aquaporin-Funktion noch Arsenatreduktase-Funktion in verschiedenen Testsystemen, obwohl Strop1447 in *S. tropica* als ein vollständiges Fusionsprotein exprimiert ist (s. Abb. 4.27). Um zu wissen, ob Strop1447 tatsächlich gar keine Rolle bei der Arsenat-Detoxifikation in *S. tropica* spielt, wurden verschiedene Knockout-Stämme (Δ strop634, Δ strop634-arsC-D, Δ strop1447, Δ strop634,1447) hergestellt und im Anschluss wurden diese Knockout-Stämme zusammen mit Wildtyp analog zum Hefe-Wachstumsassay auf den Arsenat-haltigen Agarplatten phänotypisch untersucht (s. Abb. 4.28).

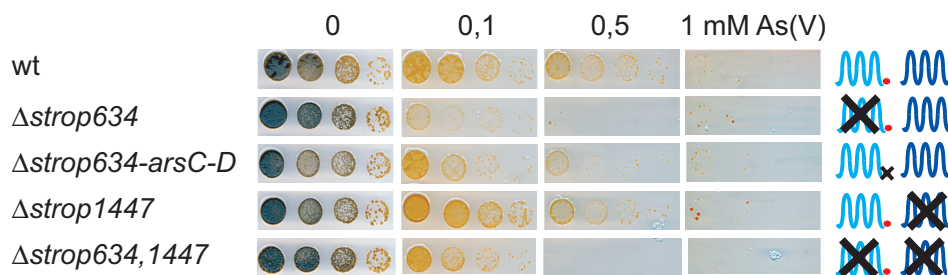


Abbildung 4.28: Arsenat-Resistenz-Assay mit *S. tropica* und dessen verschiedenen Knockout-Stämmen. Aufgetragen sind 1:10 Verdünnungen der Zellen, ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1. Die Platten wurden nach 8 d gescannt.

Die Knockout-Stämme Δ strop634 und Δ strop634,1447 waren komplett Arsenatsensitiv auf den Platten, daher ist strop634 essentiell für die ganze Arsenat-Detoxifikation in *S. tropica*. Beim Knockout-Stamm Δ strop1447 wurde ein ähnliches Wachstum wie Wildtyp gezeigt, was darauf hinwies, dass Strop1447 nicht unbedingt notwendig für die Arsenat-Detoxifikation in *S. tropica* ist. Hoch interessant wies der Knockout-Stamm Δ strop634-arsC-D, bei dem nur die Arsenatreduktase-Domäne von strop634 deletiert ist, nur ein abgeschwächtes Wachstum auf den Arsenat-haltigen Platten auf. Es schien, dass die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 nicht unverzichtbar ist und wahrscheinlich die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 zum Teil diese Reduktionsaufgabe übernehmen könnte. Zum Schluss kann man feststellen, dass die Arsenit-leitende Aquaporin-Funktion von Strop634 ausschlaggebend für die Ausscheidung von dem toxischen Arsenit ist, die Arsenatreduktion zum großen Teil durch die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634

erfolgt und unter bestimmter Bedingung deren enzymatische Funktion auch mit der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 ersetzbar ist.

4.2 Untersuchung der Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine TgAQP2 und EtAQP2 aus *T. gondii* und *E. tenella*

4.2.1 Sequenzvergleich der TgAQP2 und EtAQP2

TgAQP2 und EtAQP2 bestehen jeweils aus zwei Aquaporin-Domänen (s. Tab. 4.6). Beim Sequenzvergleich wurden die beiden Domänen getrennt betrachtet. In der folgenden Arbeit wurden alle Aquaporin-Domänen nach der Reihenfolge in Proteinsequenzen als TgAQP2a, TgAQP2b, EtAQP2a und EtAQP2b bezeichnet⁶.

Tabelle 4.6: Zuordnung der Proteinsequenz in TgAQP2 und EtAQP2

	Aquaporin-Domäne a	Aquaporin-Domäne b	gesamt
TgAQP2	216 aa	219 aa	425 aa
EtAQP2	214 aa	218 aa	424 aa

Sequenzalignment und Stammbaumanalyse der Aquaporin-Domänen von TgAQP2 und EtAQP2

Die Proteinsequenzen von vier Aquaporin-Domänen wurden mit einander verglichen. Sie alle zeigten eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit (Score zwischen 61-65 beim T-Coffee Alignment, identische Proteinsequenz: TgAQP2a/TaAQP2b (18,5 %), TgAQP2a/EtAQP2a (32,1 %), TgAQP2a/EtAQP2b (20,2 %), TgAQP2b/EtAQP2a (20,2 %), TgAQP2b/EtAQP2b (25,6 %), EtAQP2a/EtAQP2b (20,9 %)). Die Stammbaumanalyse mit zehn Human Aquaporinen, sowie anderen bekannten Aquaporinen z. B. dem orthodoxen Aquaporin EcAQPZ und den Aquaglyceroporinen EcGlpF und PfAQP zeigte, dass diese vier Aquaporine weder zur orthodoxen Aquaporin-Subfamilie noch zur Aquaglyceroporin-Subfamilie direkt gehören (s. Abb. 4.29).

⁶Bei der Subklonierung wurde die eventuelle Überlappungszone zwischen den beiden Aquaporin-Domänen berücksichtigt. Daher ist die gesamte Proteinsequenz kleiner als zwei Einzel zusam-

4.2 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *T. gondii* und *E. tenella*

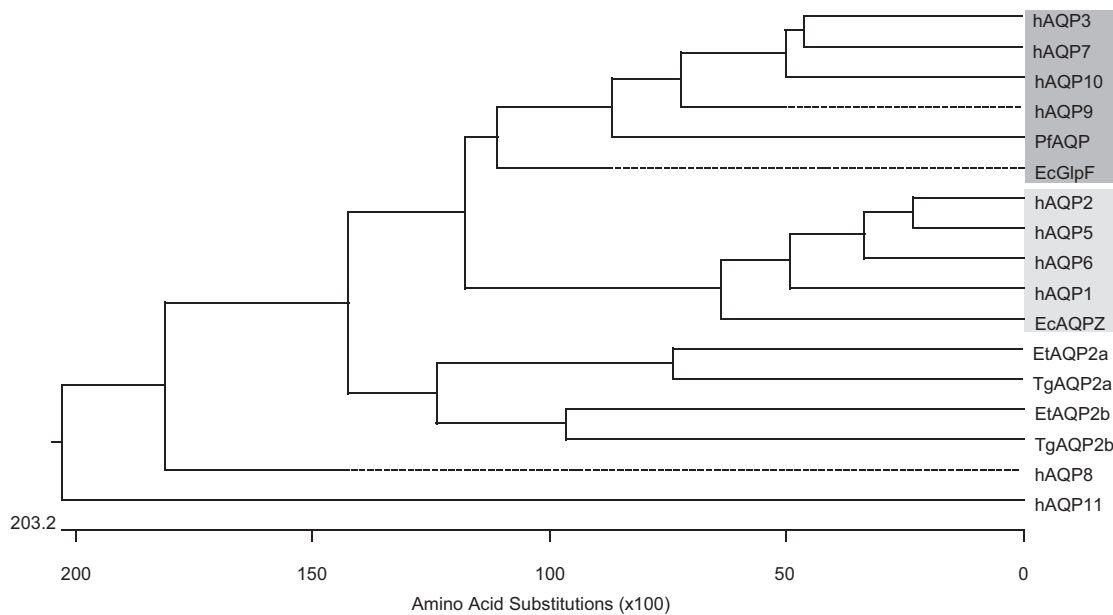


Abbildung 4.29: Stammbaumanalyse aller vier Aquaporin-Domänen (TgAQP2a, TgAQP2b, EtAQP2a und EtAQP2b) mit einigen bekannten Aquaporinen. Der dunkelgrau markierte Kasten ist Aquaglyceroporin-Subfamilie, der hellgrau markierte Kasten ist orthodexe Aquaporin-Subfamilie. Das AQP8 und AQP11 werden häufig als Sonderform der MIP-Familie dargestellt, die phylogenetisch nicht direkt zu den beiden Aquaporin-Subfamilien passen [3]. (Alignment durchgeführt mit Clustal W-Methode, Erstellung der Abbildung mit MegAlign)

Vergleich der NPA-Region und aromatischen/Arginin-Region (ar/R) der Aquaporin-Domänen

Durch das Alignment wurden die putative NPA-Region bzw. ar/R-Region von allen vier Aquaporin-Domänen festgestellt. Die Filterregionen wurden zusammen mit einem orthodoxen Aquaporin (hAQP1) und drei typischen Aquaglyceroporinen (EcGlpF, PfAQP und hAQP3) verglichen (s. Tab. 4.7).

Die NPA-Region von allen vier Aquaporin-Domänen sind unterschiedlich aufgebaut. Bei EtAQP2 bzw. EtAQP2a und EtAQP2b besteht NPA-Region wie typische Aquaporine aus Asparagin, Prolin und Alanin. Die normalerweise hochkonservierte NPA-Region ist beim TgAQP2 bzw. TgAQP2a und TgAQP2b stark verändert. Beim ersten NPA-Motiv von TgAQP2a (auch als das erste NPA-Motiv vom Fusionsprotein TgAQP2 bezeichnet) ist das Alanin durch ein Isoleucin ersetzt, somit entsteht kein NPA-Motiv, sondern ein NPI-Motiv. Diese Änderung ist zwar selten

men.

Tabelle 4.7: Vergleich der Filterregionen (NPA-Region und ar/R-Region) der Aquaporin-Domänen mit dem orthodoxen hAQP1 und einigen typischen Aquaglyceroporinen

	NPA-Region	ar/R-Region
hAQP1	NPA, NPA	FHCR
EcGlpF	NPA, NPA	WGFR
PfAQP	NLA, NPS	WGFR
hAQP3	NPA, NPA	FGYR
TgAQP2a	N60PI, N167PA	L35 A155 G164 V170
TgAQP2b	N59PA, N165VQ	I36 V153 V162 T168
EtAQP2a	N58PA, N165PA	L38 S154 A162 V168
EtAQP2b	N57PA, N165PA	L37 L153 V162 T168

(5 von 1008 Aquaporinen aus der Datenbank MIPModDB) aber bereits bekannt [3, 19, 113]. Im Gegensatz dazu ist die Änderung im zweiten NPA-Motiv von TgAQP2b (auch als das vierten NPA-Motiv von TgAQP2 bezeichnet) sehr ungewöhnlich, hier sind die zweite und dritte Aminosäure im NPA-Motiv das Prolin und das Alanin gleichzeitig durch Valin und Glutamin ersetzt. Somit entsteht ein NVQ-Motiv in der NPA-Region. Diese Änderung ist bisher noch nicht bekannt. Es ist noch vorstellbar, ein unpolares und neutrales Prolin mit einem gleich unpolaren und neutralen Valin in der zweite Position vom NPA-Motiv auszutauschen. Allerdings ist ein Austausch vom Alanin mit Glutamin in Bezug auf sowohl ihrer Ladung als auch ihre Größe für ein typisches Aquaporin ungewöhnlich.

Die ar/R-Region von allen vier Aquaporin-Domänen wurde putativ durch das Alignment festgestellt. Es ist erstaunlich, dass in allen putativen ar/R-Regionen kein Arginin vorhanden ist (s. Tab. 4.7). Um den möglichen Fehler beim Alignment auszuschließen wurde die Proteinsequenz hinter dem zweiten NPA-Motiv analysiert (s. Abb. 4.30). Bei allen vier Aquaporin-Domänen gibt es kein Arginin in diesem Bereich.

Die Aquaporine TgAQP2 (TgAQP2a und TgAQP2b) und EtAQP2 (EtAQP2a und EtAQP2b) konnten anhand ihrer Proteinsequenzen und strukturellen Filterregionen nicht direkt zugeordnet werden, um welche Aquaporin-Subfamilie sie sich handeln. Wegen ihrer kurzen Sequenzlänge wurde ein kurzer N- bzw. C-Terminus sowohl bei den putativen Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteinen als auch bei den künstlich erzeugten Aquaporin-Domänen erwartet.

4.2 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *T. gondii* und *E. tenella*

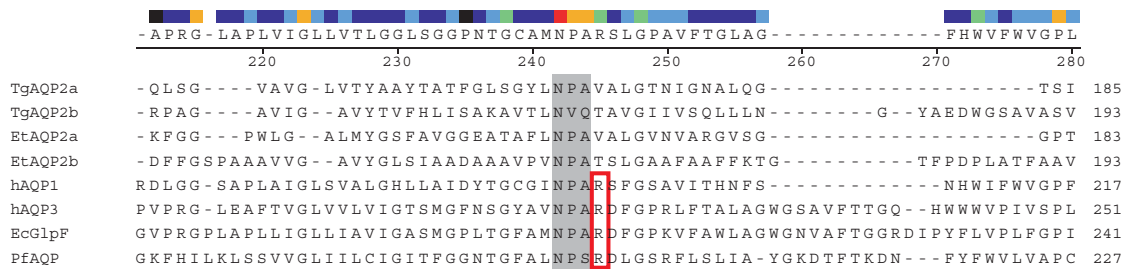


Abbildung 4.30: Vergleich der Sequenzbereiche um das Arginin in der ar/R-Region von allen vier Aquaporin-Domänen mit hAQP1, hAQP3, EcGlpF und PfAQP. Der grau markierte Kasten ist das zweite NPA-Motiv in der NPA-Region für die jeweiligen Aquaporine und Domänen. Der rot markierte Kasten ist das hochkonservierte Arginin in der ar/R-Region.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung von Fusionsproteinen TgAQP2, EtAQP2 und deren Aquaporin-Domänen

Expressionskontrolle von TgAQP2, EtAQP2 und deren jeweiligen Aquaporin-Domänen in *S. cerevisiae*

Alle Gene wurden zuerst in einen Hefeexpressionsvektor pHA_RS426MET25 subkloniert und je nach den zu durchführenden Assays in verschiedenen Hefestämmen transformiert. Zur Überprüfung der Aquaporinexpression wurde die jeweilige mikrosomale Fraktion der transformierten Hefezellen isoliert. Der Western Blot der mikrosomalen Fraktionen zeigte eine deutliche Expression sowohl bei den Fusionsproteinen (TgAQP2 und EtAQP2) als auch bei den jeweiligen Aquaporin-Domänen (TgAQP2a, TgAQP2b, EtAQP2a und EtAQP2b) (s. Abb. 4.31).

Untersuchung der Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit

Zur Untersuchung der Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit wurde ein Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay durchgeführt (s. Abb. 4.32). Ein verstärktes Wachstum von Hefezellen des Stammes 31019Δfps1, bei dem sowohl das endogene Ammoniak-leitende Aquaglyceroporin ScFps1, als auch die drei endogenen Ammoniumtransporter Mep1-3 deletiert sind, kann auf die Aufnahme vom ungeladenen Ammoniak oder geladenen Ammonium durch heterolog exprimierte Aqua(glycero)porine hindeuten. Hier wurde PfAQP als Positivkontrolle eingesetzt und PfAQP zeigte wie erwartet ein deutlich stärkeres Wachstum auf der Platte bei pH 7,2 im Vergleich zur Negativkontrolle (Leerplasmid), da PfAQP das ungeladene Ammoniak leiten konnte. Die zu untersuchenden Aquaporine wiesen auf der

4 Ergebnisse

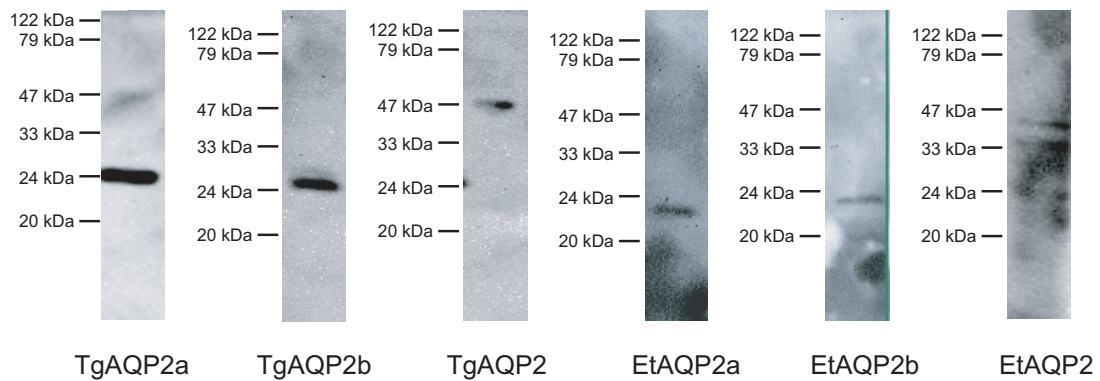


Abbildung 4.31: Western Blot der mikrosomalen Fraktion von den transformierten Hefezellen des Stammes BY4742 Δ fps1. Es wurde jeweils 30 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper (Maus-Anti-HA (0,2 mg/ml) 1:5000) und sekundärantikörper (Anti-Maus (0,2 mg/ml) 1:5000). Die erwarteten Proteinbanden waren mit der richtigen Größe auf dem Western Blot zu finden (TgAQP2a: 24,3 kDa, TgAQP2b: 26,2 kDa, TgAQP2: 47 kDa, EtAQP2a: 23,2 kDa, EtAQP2b: 23,2 kDa, EtAQP2: 44,1 kDa).

selben Platte wie Negativkontrolle ein deutlich reduziertes Wachstum auf, was auf keine (erkennbare) Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit der zu untersuchenden Aquaporine zurückgeführt werden konnte. Auf der Platte bei pH 5,5 wurden keine Wachstumsunterschiede wegen des starken Hintergrundwachstums festgestellt. Die Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit von den zu untersuchenden Aquaporinen konnte bei diesem Assay nicht nachgewiesen werden.

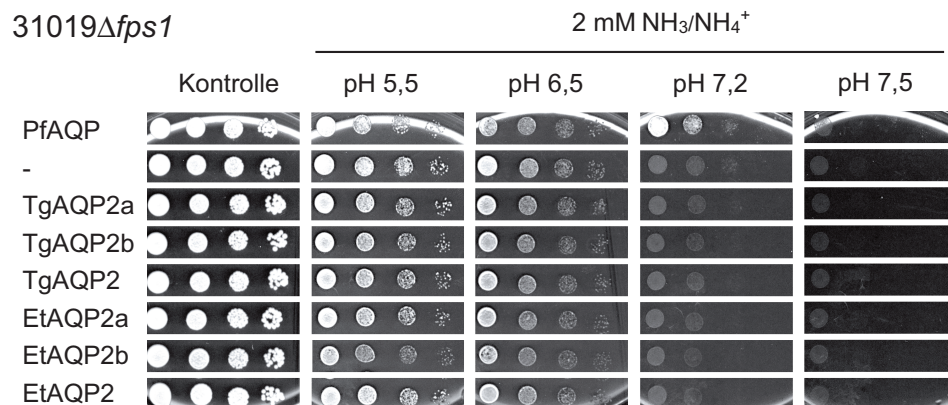


Abbildung 4.32: Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay im Hefestamm 31019 Δ fps1. Die Agarplatten mit 2 mM Ammoniak/Ammonium und pH 5,5/6,5/7,2/7,5 sowie Kontrollplatte wurden nach 5 d Inkubation ausgewertet.

Untersuchung der Methylamin/Methylammonium-Leitfähigkeit durch Methylamin-Efflux-Assay

Zur Untersuchung der Methylamin/Methylammonium-Leitfähigkeit wurde zuerst ein Methylamin-Efflux-Assay durchgeführt (s. Abb. 4.33). Hier wurde der Hefestamm BY4742 Δ fps1 verwendet, dessen endogenes Gen für das Methylaminleitendes Aquaglyceroporin ScFps1 deletiert ist. Die Zellen können in diesem Assay nur überleben, wenn ein heterolog exprimiertes Aquaglyceroporin in den Zellen das toxische Methylamin ausschleusen kann. Als Positivkontrolle diente eine mit PfAQP transformierte Hefe, die in diesem Assay den Efflux vom toxischen ungeladenen Methylamin nach dem chemischen Gradienten aus den Hefezellen ermöglicht. Ein deutliches Wachstum von PfAQP wurde vor allem auf den Platten beim niedrigen pH-Wert (pH 5,5) gezeigt, da der vom Zytosol (pH 7,2) nach außen gerichtete Methylamingradient am größten ist. Das Wachstum von Hefezellen mit dem Leerplasmid (Negativkontrolle) und mit den zu untersuchenden Aquaporinen (Fusionsproteinen und Aquaporin-Domänen) war im Vergleich zur Positivkontrolle PfAQP sehr schwach. Für das fehlende oder schwache Wachstum mit den zu untersuchenden Aquaporinen konnte es sein, dass einerseits die Aquaporine das ungeladene Methylamin nicht leiten konnten wie die Negativkontrolle, sodass das toxische Methylamin in die Hefezellen akkumulierte wurde. Andererseits konnte es auch sein, dass sie ihre Kationfilterfunktion wegen der ungewöhnlichen Struktur und Konstruktion (Homodimer, Filterregion vor allem ar/R-Region) verlieren konnten und das geladene Methylammonium entlang des chemischen Gradienten durch die Aquaporine in die Hefezellen gelangen konnte.

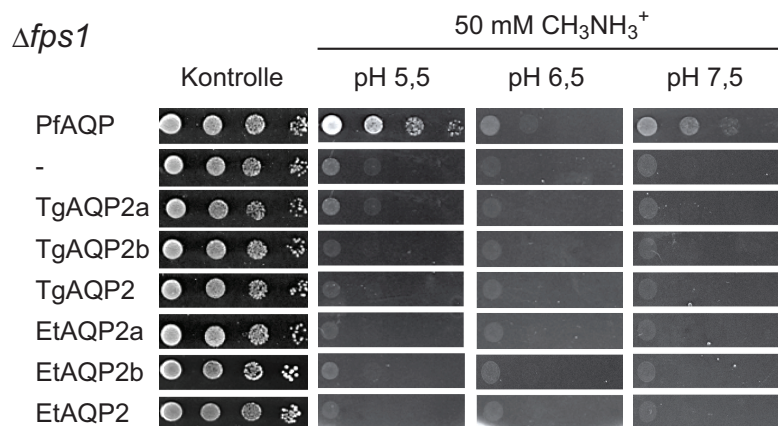


Abbildung 4.33: Methylamin-Efflux-Assay im Hefestamm BY4742 Δ fps1. Die Agarplatten mit 50 mM Methylamin/Methylammonium und pH 5,5/6,5/7,5 sowie Kontrollplatte wurden nach 5 d Inkubation ausgewertet.

Untersuchung der Methylamin/Methylammonium-Leitfähigkeit durch Methylamin/Methylammonium-Aufnahme-Assay

Beim normalen Methylamin-Efflux-Assay wird Hefestamm BY4742 Δ fps1 eingesetzt, bei dem drei endogene Ammoniumtransporter (Mep1-3) noch vorhanden sind, um das Methylammonium zuerst aus dem Medium in die Zellen einzuschleusen, bevor es als ungeladenes Methylamin durch Aquaglyceroporine wieder ausgeschieden werden kann. Allerdings falls die zu untersuchenden Aquaporine selbst Ionen (in diesem Fall Methylammonium) leiten können, kann die Methylamin-Leitfähigkeit aufgrund des Einstroms von Methylammonium und das fehlenden Wachstums nicht geprüft werden. Dazu wurde ein Methylamin/Methylammonium-Aufnahme-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay wurde statt des Hefestammes BY4742 Δ fps1 der Hefestamm 31019 Δ fps1 verwendet, dessen eigene Ammoniumtransporter Mep1-3 neben dem endogenen Aquaglyceroporin ScFps1 auch deletiert sind. Die Assay-Platten waren dieselben Platten für den normalen Methylamin-Efflux-Assay. Auf den Platten kann das toxische Methylammonium normalerweise nicht in die Hefezellen passieren wegen der fehlenden Ammoniumtransporter. Wenn aber die zu untersuchenden Aquaporine das geladene Methylammonium leiten können, soll ein reduziertes Wachstum von Hefezellen gezeigt werden. Als Kontrolle dienten PfAQP (Positivkontrolle) und Leerplasmid (Negativkontrolle).

Auf den Platten wurde das Wachstumsverhalten der Hefezellen verglichen (s. Abb. 4.34). Alle Hefezellen zeigten nach 5 Tagen Inkubation ein ähnliches Wachstumsverhalten. Sie sind alle gut gewachsen auf der Platte mit pH 5,5, da das toxische Methylamin/Methylammonium nicht in die Zellen gelangen konnte. Auf den Platten mit pH 6,5 und 7,5 wurde nach 5 Tagen Inkubation ein stark reduziertes Wachstum bei allen Zellen gezeigt. Wahrscheinlich war das ungeladene Methylamin doch in der Lage, durch Diffusion in die Hefezellen zu gelangen. Das Ergebnis von diesem Assay nach 5 Tagen wies keine Methylammonium-Leitfähigkeit von den zu untersuchenden Aquaporinen auf.

Die Platten wurden für weitere 3 Tage bei 29°C inkubiert. Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf der Platte mit pH 6,5 wurde beobachtet. PfAQP und TgAQP2 zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle und den anderen ein deutliches Wachstum.

Einige Aquaporine können sich in intrazellulären Membranen lokalisieren, z. B. hAQP6 in intrazellulären Vesikelmembranen [114], einige pflanzliche Aquaporine wie AtTIP1;1 in Vakuolenmembranen [115, 116] und einige Aquaporine aus Parasiten wie TcAQP aus *Trypanosoma cruzi* [117], LmAQP1 aus *Leishmania major* [118], TgAQP1 aus *Toxoplasma gondii* [78] in Acidocalcisomen und kontraktilen Vakuolenmembranen. Hier wurde postuliert, dass das PfAQP und TgAQP2 sich

4.2 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *T. gondii* und *E. tenella*

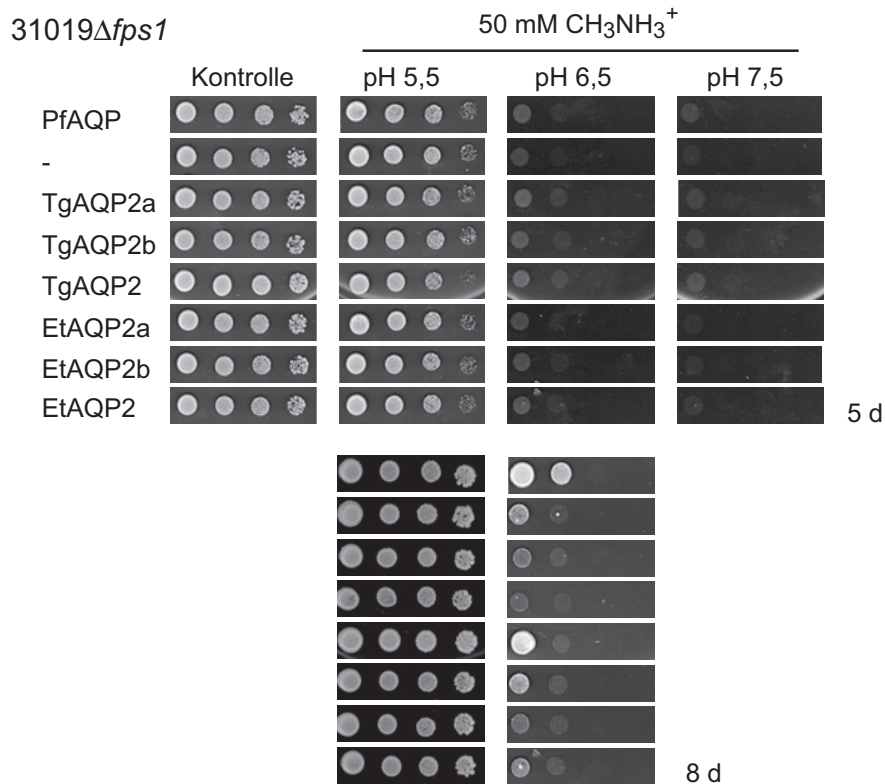


Abbildung 4.34: Methylamin-/Methylammonium-Aufnahme-Assay im Hefestamm 31019Δfps1. Die Agarplatten mit 50 mM Methylamin/Methylammonium und pH 5,5/6,5/7,5 sowie Kontrollplatte wurden nach 5 d Inkubation ausgewertet, zusätzlich wurden die Platten mit pH 5,5/6,5 nach 8 d Inkubation verfolgt.

möglicherweise zum Teil in Vakuolenmembranen der Hefezellen befanden und das durch Diffusion in die Zellen gelangene Methylamin als ungeladene Form durch die beiden Aquaporine weiter in die Hefevakuolen transportiert wurde. Wegen des sauren inneren Milieus in Hefevakuolen wurde das Methylamin dort wieder protoniert und akkumuliert. Damit überleben die Hefezellen mit den beiden Aquaporinen auf der Methylamin/Methylammonium-haltigen Platte mit pH 6,5. Auf der Platte mit pH 7,5 war die Konzentration vom ungeladenen Methylamin im Vergleich zu der Platte mit pH 6,5 um Faktor 10 erhöht, und die Akkumulation in den Vakuolen war nicht ausreichend für das Überleben der Hefezellen.

Die Methylamin-Leitfähigkeit vom Fusionsprotein TgAQP2 konnte unter dieser Testbedingung erkannt und aufgeklärt werden. Es ist allerdings erforderlich, die genaue Lokalisation von TgAQP2 in den Hefezellen zu überprüfen.

Kalium-Aufnahme-Assay

Bei diesem Assay wurde die Kalium-Leitfähigkeit durch Aquaporine untersucht. Die Aquaporine sind normalerweise undurchlässig für Protonen und Kationen [119]. Aufgrund der Besonderheit von TgAQP2 und EtAQP2 in ihrer Zentralpore und Proteinsequenzen in den Filterregionen wurde die Kalium-Leitfähigkeit von TgAQP2 und EtAQP2 sowie ihren jeweiligen Aquaporin-Domänen getestet.

Hier wurde der Hefestamm CY162 eingesetzt. Wegen der fehlenden endogenen Kaliumtransporter kann dieser Hefestamm ohne Kalium-leitende Kanalproteine bei minimalen Kaliumkonzentrationen im Medium nicht überleben. Auf den Platten (0,1/0,5/1/2 mM KCl) waren nach 5 Tagen Inkubation keine Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Aquaporinen und der Negativkontrolle zu sehen (s. Abb. 4.35). Damit konnte keine Kalium-Leitfähigkeit von den zu untersuchenden Aquaporinen nachgewiesen werden.

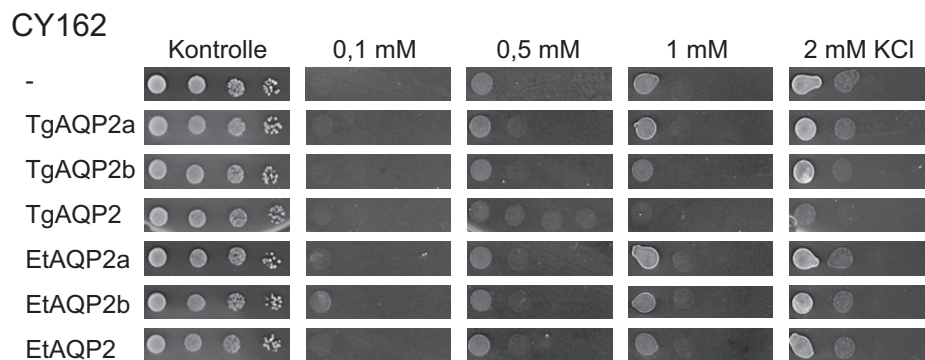


Abbildung 4.35: Kalium-Aufnahme-Assay im Hefestamm CY162. Die AP-Minimal-medium-Agarplatten mit 0,1/0,5/1/2 mM KCl sowie Kontrollplatte wurden nach 5 d Inkubation ausgewertet.

Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeitsmessung mit der Stopped-Flow-Apparatur

Die Messung der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von TgAQP2 und EtAQP2 sowie ihren jeweiligen Aquaporin-Domänen erfolgte mit einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung bei einer Stopped-Flow-Apparatur nach dem Standardprotokoll. Dazu wurden die in einem Saccharose-basierten Puffersystem präparierten Protoplasten (zu untersuchende Aquaporine und Negativkontrolle) (1,2 M Saccharose) mit einem hyperosmotischen Testpuffer (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 gemischt, es entstanden somit

4.2 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *T. gondii* und *E. tenella*

gleichzeitig ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient (300 mOsm/l) und ein einwärts gerichteter Glycerol-Gradient (300 mM). Sowohl die Wasser-Leitfähigkeit als auch die Glycerol-Leitfähigkeit konnten gleichzeitig mittels einer Messkurve ermittelt und mit einander verglichen werden (s. Abb. 4.36).

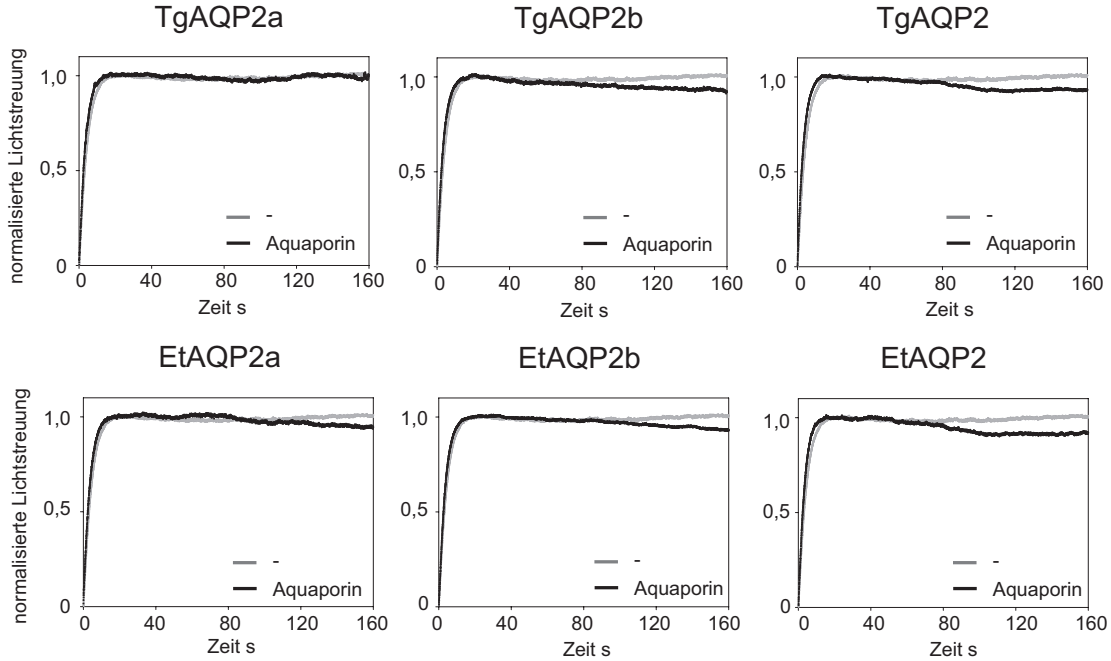


Abbildung 4.36: Messung der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von TgAQP2 und EtAQP2 sowie ihren jeweiligen Aquaporin-Domänen. Gezeigt wurde ein eventueller zweiphasiger Kurvenverlauf mit dem Wasseraustritt und Glyceroleinstrom (grau: Negativkontrolle, schwarz: zu testende Aquaporine).

Die erste ansteigende Phase des Kurvenverlaufs beschrieb den Wasseraustritt über die Protoplastenmembran. Die eventuell abfallende zweite Phase des Kurvenverlaufs war auf den langsamen Glyceroleinstrom zurückzuführen. Die Wasser-Leitfähigkeit von den zu untersuchenden Aquaporinen (Fusionsproteinen TgAQP2 und EtAQP2, sowie jeweiligen Aquaporin-Domänen) war nicht mit der Negativkontrolle (Leerplasmid) zu unterscheiden und lagen alle τ -Werte bei 3,5-4,2 s. Bei der Auswertung der Glycerol-Leitfähigkeit zeigte die mit Leerplasmid transformierten Protoplasten keinen Glyceroleinstrom, ebenfalls war auch keine Glycerol-Leitfähigkeit bei TgAQP2a und EtAQP2a zu sehen. Die anderen Aquaporine (TgAQP2, TgAQP2b, EtAQP2, EtAQP2b) konnten möglicherweise Glycerol leiten, allerdings mit einem sehr kleinen k_{Gly} -Wert zwischen 10^{-3} s^{-1} und 10^{-4} s^{-1} .

4.3 Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins PfAQP aus *Plasmodium falciparum* - ein wirklich gut Wasser-leitendes Aquaglyceroporin?

Die Daten zu diesem Kapitel sind bereits veröffentlicht in „Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the Plasmodium aquaglyceroporin but not that of *E. coli*: Involvement of the channel vestibules.“ (*Biochim Biophys Acta*) [120].

PfAQP und EcGlpF sind die beiden bisher gut charakterisierten Aquaglyceroporine. Ihre Proteinsequenz und bereits entschlüsselte Kristallstruktur im Kanalbereich weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Trotzdem gibt es immer noch widersprüchliche Messdaten über die Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF und PfAQP. Die Theoretiker behaupten mittels ihrer Computersimulation, dass die EcGlpF und PfAQP als typische Aquaglyceroporine gut Wasser-leitend seien [121, 122], aber viele experimentelle Messdaten widersprechen diesen Aussagen mit den Fakten, dass die Aquaglyceroporine vor allem EcGlpF schlechter sogar keine Wasser-Leitfähigkeit zeigten [123, 124]. Ob eine hohe Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP wirklich vorhanden ist, ist auch aufgrund der unterschiedlichen Messdaten noch umstritten [79, 81, 82].

Um eine richtige Aussage über die Wasser-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen zu treffen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Wasser-Leitfähigkeit sowie die Solut-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF direkt in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung unter verschiedenen Testbedingungen (Osmolyt-Systemen) getestet und mit einander verglichen.

4.3.1 Vergleich der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten bei Stopped-Flow- Messung

Diese Arbeit wurde zusammen mit Abdalnasser Almasalmeh und Dawid Krenc durchgeführt ⁷.

⁷Abdalnasser Almasalmeh hat das Experiment für die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten (Sorbitol, Saccharose, PEG 300 und Glycerol) durchgeführt.

4.3 Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins aus *P. falciparum*

Zum Vergleich der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten wurden zuerst die Protoplasten aus den jeweils mit PfAQP-pDR196-HA, EcGlpF-pDR196-HA sowie Positivkontrolle rAQP1-pRS und Negativkontrolle pDR196-HA transformierten Hefezellen des Stammes BY4742 Δ fps1 in verschiedenen Osmolyten nach dem Standardprotokoll präpariert. Dazu wurden Saccharose, Sorbitol, PEG 300 und Glycerol als Osmolyte für die Puffer ausgewählt. Die Messung erfolgte standardmäßig mittels eines auswärts gerichteten osmotischen Gradienten von 300 mOsm/l.

Als Positivkontrolle zeigte die im Sorbitol-basierten Puffersystem präparierten Protoplasten von rAQP1 einen deutlich schnellen Wasserausstrom mit einem τ -Wert von 0,4s. Die Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1 ist daher 19fach schneller als die Negativkontrolle (mit Leerplasmid transformierten Protoplasten, $\tau = 7,6$ s). Allerdings zeigten weder die mit PfAQP noch die mit EcGlpF transformierten Protoplasten eine erkennbare Wasser-Leitfähigkeit durch die beiden Aquaglyceroporine im Vergleich mit der Negativkontrolle. Diese Ergebnisse entsprachen auch den Messdaten von Hedfalk *et al.* [82]⁸ und Fu *et al.* [123]⁹ Daher wurde keine Wasser-Leitfähigkeit von den beiden Aquaglyceroporinen in diesem Sorbitol-basierten Testsystem nachgewiesen (s. Abb. 4.37).

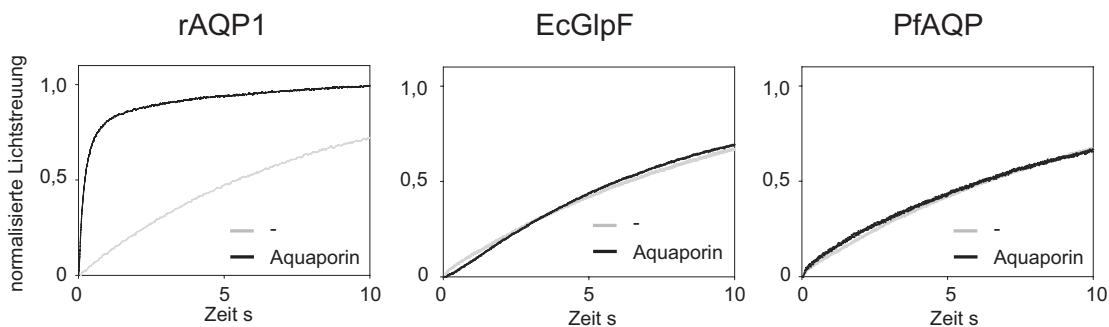


Abbildung 4.37: Messung der Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1, EcGlpF und PfAQP im Sorbitol-basierten Testsystem. Ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient (300 mOsm/l) führte zur Schrumpfung der Protoplasten und Zunahme der Lichtstreuung. (grau: Negativkontrolle, schwarz: zu testende Aquaporine)

Die Wasser-Permeabilität von PfAQP wurde jedoch bei vielen anderen Gruppen

⁸Bei Hedfalk *et al.* wurde die PfAQP-Protoplasten in einem Sorbitol-basierten Puffersystem präpariert und die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP getestet. Keine Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP wurde nachgewiesen.

⁹Bei Fu *et al.* wurde die Wasser-Leitfähigkeit von den EcGlpF-Liposomen in einem Mannitol-basierten Testsystem [125] getestet. Keine Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF wurde nachgewiesen. Mannitol und Sorbitol sind Diastereomer und weisen als Osmolyt ähnliche Eigenschaften auf.

4 Ergebnisse

in verschiedenen Testsystemen wie Oocyten-Schwelltests [30, 79] und Liposome-Lichtstreuungsmessung [81] mehrfach bestätigt. Die Testsysteme von Hedfalk *et al.* (Protoplasten) und Newby *et al.* (Liposome) waren beide dynamische Lichtstreuungsmessung basierte Methoden, ein Unterschied zwischen den beiden Messungen war die eingesetzten Osmolyte: statt Sorbitol wurde Saccharose als Osmolyt-System bei Newby's Gruppe für die Messung verwendet. Sorbitol und Saccharose als am häufigsten bei der Stopped-Flow-Messung eingesetzte Osmolyte sind meistens unbedenklich geeignet, weil sie wegen ihrer Größe normalerweise nicht direkt durch die Aquaporine passieren können. Hier wurde überlegt, ob die Widersprüchlichen Messdaten auf diesen Osmolyt-Unterschied zurückgeführt werden konnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Protoplasten aus den gleichen Hefezellen (PfAQP, EcGlpF sowie Positivkontrolle und Negativkontrolle) in drei anderen Puffersystemen (Saccharose, PEG 300 und Glycerol) präpariert und auf ihre Wasser-Leitfähigkeit getestet.

In dem Saccharose-basierten Testsystem waren alle Schrumpfungskurven (rAQP1, EcGlpF, PfAQP und Negativkontrolle) deutlich schneller gelaufen als sie beim Sorbitol-basierten Testsystem (s. Abb. 4.38). Das Verhältnis von der Positivkontrolle rAQP1 ($\tau = 0,25\text{ s}$) und Negativkontrolle ($\tau = 3,8\text{ s}$) war aber unbeeinflusst auf 15fach geblieben. EcGlpF zeigte hier wiederum keine Wasser-Leitfähigkeit im Vergleich mit der Negativkontrolle ($\tau = 3,8\text{ s}$). Interessanterweise war bei den PfAQP-Protoplasten 3fach ($\tau = 1,2\text{ s}$) schneller Wasser-Leitfähigkeit als die Negativkontrolle zu beobachten.

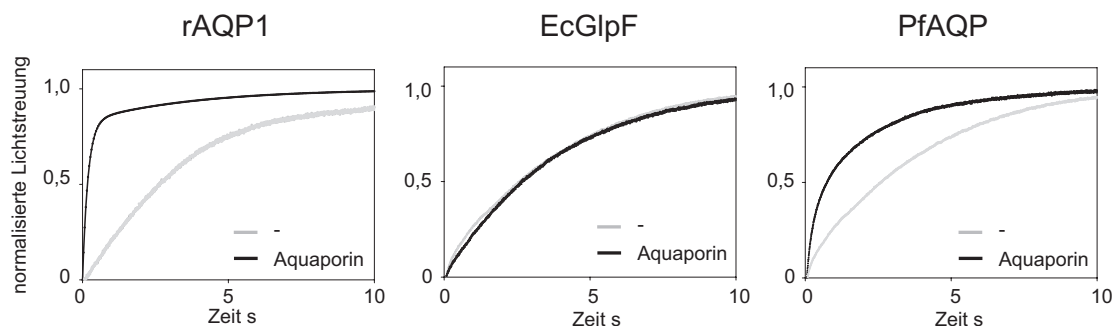


Abbildung 4.38: Messung der Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1, EcGlpF und PfAQP im Saccharose-basierten Testsystem mit 300 mOsm/l auswärts gerichteten Gradienten. (grau: Negativkontrolle, schwarz: zu testende Aquaporine)

In diesem Protoplasten-basierten Testsystem wurde unabhängig von den eingesetzten Osmolyten keine Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF gezeigt. Die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP war dagegen Osmolyt-abhängig. Um zu überprüfen, ob andere Osmolyte auch die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP beeinflussen können, wurden PfAQP im Anschluss zusammen mit rAQP1 und der Negativkontrolle

4.3 Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins aus *P. falciparum*

in zwei weiteren Puffersystemen (PEG 300 und Glycerol) protoplastiert und wie eben hyperosmotisch getestet. Im PEG 300-basierten Testsystem war die gesamte Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP im Vergleich zu der im Saccharose-basierten Testsystem kleiner geworden ($\tau = 5,6$ s) aber immer noch fast zweifach schneller als die Negativkontrolle ($\tau = 10$ s). Die Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1 lag unverändert 15fach schneller als die Negativkontrolle ($\tau = 0,6$ s) (s. Abb. 4.39). Im Glycerol-basierten Testsystem war der Wasserausstrom allgemein verlangsamt mit der Ausnahme von rAQP1 ($\tau = 0,7$ s). Die Schrumpfungskurven von PfAQP und Negativkontrolle lagen verhältnismäßig sehr nah bei einander mit dem τ -Wert zwischen 25-30 s (s. Abb. 4.40).

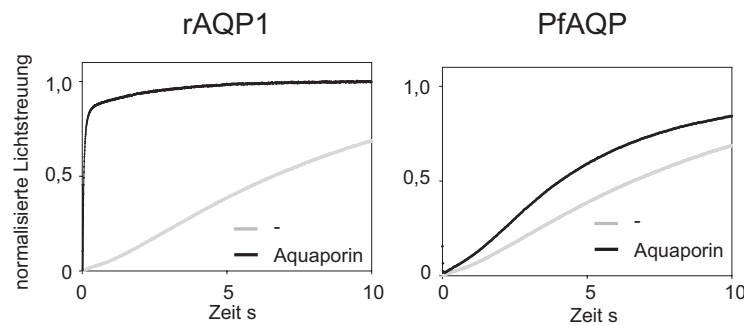


Abbildung 4.39: Messung der Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1 und PfAQP im PEG 300-basierten Testsystem mit 300 mOsm/l auswärts gerichteten Gradienten. (grau: Negativkontrolle, schwarz: zu testende Aquaporine)

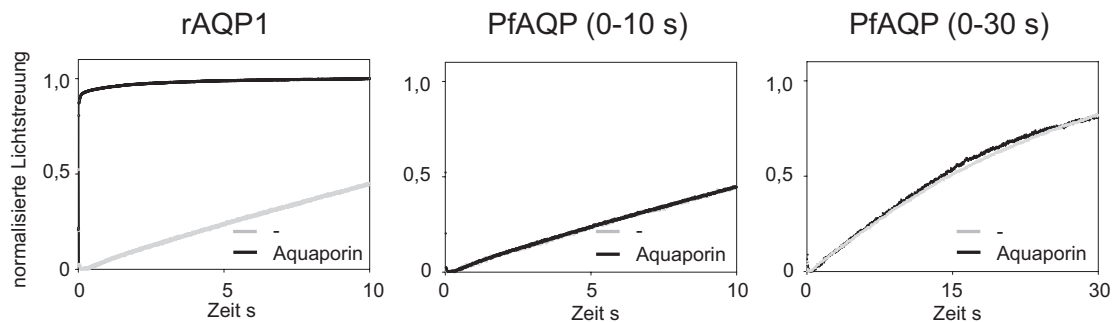


Abbildung 4.40: Messung der Wasser-Leitfähigkeit von rAQP1 und PfAQP im Glycerol-basierten Testsystem mit 300 mOsm/l auswärts gerichteten Gradienten. Der Kurvenverlauf von PfAQP und Negativkontrolle war sehr langsam. Hier wurde auch ein Kurvenaufnahme mit 30 s für die beiden gezeigt. (grau: Negativkontrolle, schwarz: zu testende Aquaporine)

Die Kurvenaufnahme mit den verschiedenen Osmolyt-Systemen zeigte, dass die Auswahl der Osmolyte bei der Stopped-Flow-Messung auch den Einfluss auf das

4 Ergebnisse

gesamte Änderungsverhalten von Protoplastenvolumen hatte, z. B. die Negativkontrolle und Positivkontrolle in den verschiedenen Puffersystemen zeigten auch unterschiedliche Volumenänderungsraten (τ -Werte). Um die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP in den verschiedenen Puffersystemen direkt vergleichen zu können, wurde hier eine reine Wasser-Leitfähigkeit durch PfAQP mit Berücksichtigung von der einfachen Wasserdiffusion über die Membran (Negativkontrolle) in den verschiedenen Osmolyt-Systemen berechnet. Dazu wurde zuerst eine gesamte Ratenkonstante für die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP k_1 in den verschiedenen Osmolyt-Systemen durch ein einfach oder zweifach exponentielles Kurvenfitting ermittelt, in der gleichen Weise wurde eine Ratenkonstante k_2 für die Wasserdiffusion in den entsprechenden Osmolyt-Systemen (Negativkontrolle) kalkuliert. Die berechnete Ratenkonstante für die reine Wasser-Leitfähigkeit durch PfAQP ($k_1 - k_2$, (s. Tab. 4.8)) in den verschiedenen Osmolyt-Systemen wurde graphisch dargestellt (s. Abb. 4.41).

Tabelle 4.8: Berechnung der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP in verschiedenen Osmolyt-Systemen

	k_1 (k_{gesamt}) s^{-1}	k_2 ($k_{\text{Diffusion}}$) s^{-1}	$k_1 - k_2$ (k_{PfAQP}) s^{-1}
Sorbitol	0,10	0,10	0,00
Saccharose	0,37	0,14	0,23
PEG 300	0,18	0,10	0,08
Glycerol	0,04	0,03	0,01

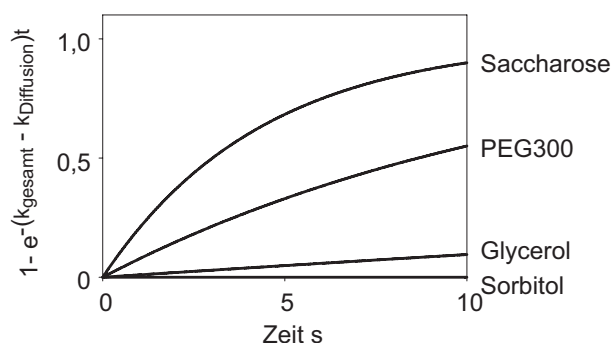


Abbildung 4.41: Graphische Darstellung der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP mit den berechneten k -Werten. Die k -Werte wurde in einer einfach exponentiellen Funktion eingesetzt. Die resultierten Kurven entsprachen der Testbedingung mit einem auswärts gerichteten osmotischen Gradienten von 300 mOsm/l in den verschiedenen Puffersystemen.

4.3.2 Hemmung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP durch Sorbitol

Es wurde deutlich in der bisherigen Arbeit gezeigt, dass die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP im Sorbitol-basierten Testsystem komplett gehemmt wurde. Hier wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung mit Sorbitol weiter untersucht.

Zuerst wurden die im normalen Saccharose-basierten Puffersystem präparierten Protoplasten (1,2 M Saccharose) mit jeweils einem hyperosmotischen Sorbitol/Saccharose-haltigen Testpuffer (1,8 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3, 1/0) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 gemischt. Dabei entstand bei allen Messungen ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient von 300 mOsm/l. Alle Schrumpfungskurven zeigten wie die Messkurve von PfAQP bei dem normalen Saccharose-basierten Testsystem (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher keine sofortige direkte konzentrationsabhängige Hemmung mit Sorbitol festgestellt. Anschließend wurden die selben im Saccharose-basierten Puffersystem präparierten PfAQP-Protoplasten (1,2 M Saccharose) jeweils in vier Saccharose/Sorbitol-haltigen Puffern (1,2 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3, 1/0) umgepuffert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die umgepufferten Protoplasten jeweils mit dem hyperosmotischen Saccharose/Sorbitol-haltigen Testpuffer mit dem gleichen Stoffmengenverhältnis (1,8 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3, 1/0) getestet. Eine langsam werdende Verschiebung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP durch die steigenden Sorbitol-Anteile im Testsystem wurde beobachtet (s. Abb. 4.42).

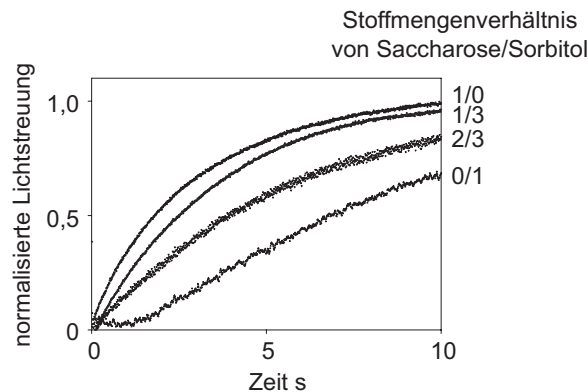


Abbildung 4.42: Hemmung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP nach der Inkubation mit dem Sorbitol-haltigen Puffer (1,2 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3 und 1/0). Bei der Messung wurde der Testpuffer mit der gleichen Stoffmengenverhältnis (1,8 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3 und 1/0) eingesetzt.

4 Ergebnisse

Um den Osmolyt-Effekt auf die Wasserdiffusion bei der Messung auszuschließen, wurden die Protoplasten von PfAQP und der Negativkontrolle (Leerplasmid) jeweils in vier Saccharose/Sorbitol-haltigen Puffersystemen (Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3, 1/0) präpariert und jeweils mit dem hyperosmotischen Saccharose/Sorbitol-haltigen Testpuffer (1,8 M, Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol: 0/1, 1/3, 2/3 und 1/0) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 gemischt. Eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Schrumpfungskurven wurde sowohl bei den PfAQP-Protoplasten als auch bei der Negativkontrolle gezeigt (s. Abb. 4.43).

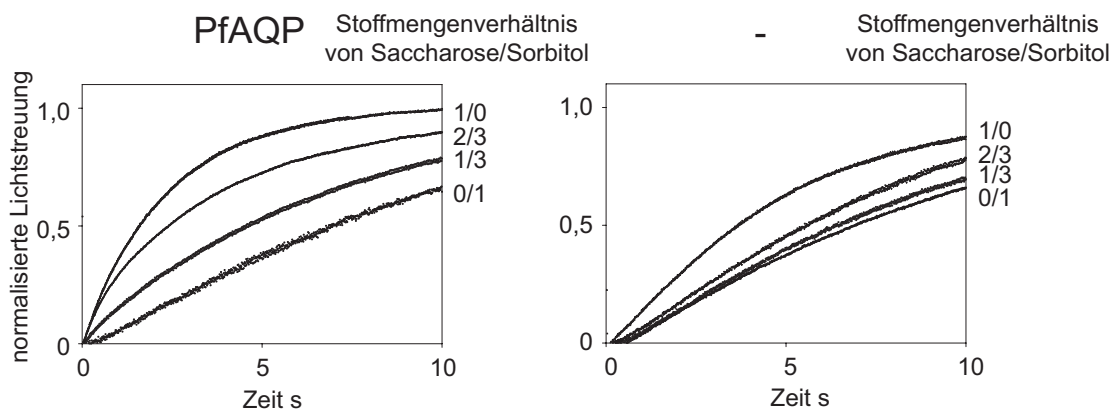


Abbildung 4.43: Hemmung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP in den Sorbitol-haltigen Testsystemen (Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol im Testsystem: 0/1, 1/3, 2/3, 1/0) (links) und die Kurvenverläufe der Negativkontrolle in den selben Testsystemen

Zur Kalkulation der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP wurden zuerst alle k-Werte für die jeweiligen Schrumpfungskurven von PfAQP und Negativkontrolle durch ein einfach oder zweifach exponentielles Kurvenfitting ermittelt. Die Differenz von den k-Werten zwischen PfAQP und der Negativkontrolle beim gleichen Stoffmengenverhältnis stellte die reine Wasser-Leitfähigkeit durch PfAQP dar (s. Tab. 4.9). Die graphische Darstellung der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP bei den verschiedenen Stoffmengenverhältnissen im Testsystem erfolgte mittels des Einsatzes der berechneten k-Werte in eine einfach exponentielle Funktion (s. Abb. 4.44). Eine Konzentrationsabhängige Hemmung von Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP mit Sorbitol ist damit angegeben.

4.3 Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins aus *P. falciparum*

Tabelle 4.9: Berechnung der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP im Saccharose/Sorbitol-haltigen Testsystem mit verschiedenen Stoffmengenverhältnissen

Stoffmengenverhältnis von Saccharose/Sorbitol	k_1 (k_{gesamt}) s^{-1}	k_2 ($k_{\text{Diffusion}}$) s^{-1}	$k_1 - k_2$ (k_{PfAQP}) s^{-1}
0/1	0,08	0,08	0,00
1/3	0,16	0,09	0,07
2/3	0,26	0,11	0,15
1/0	0,37	0,14	0,23

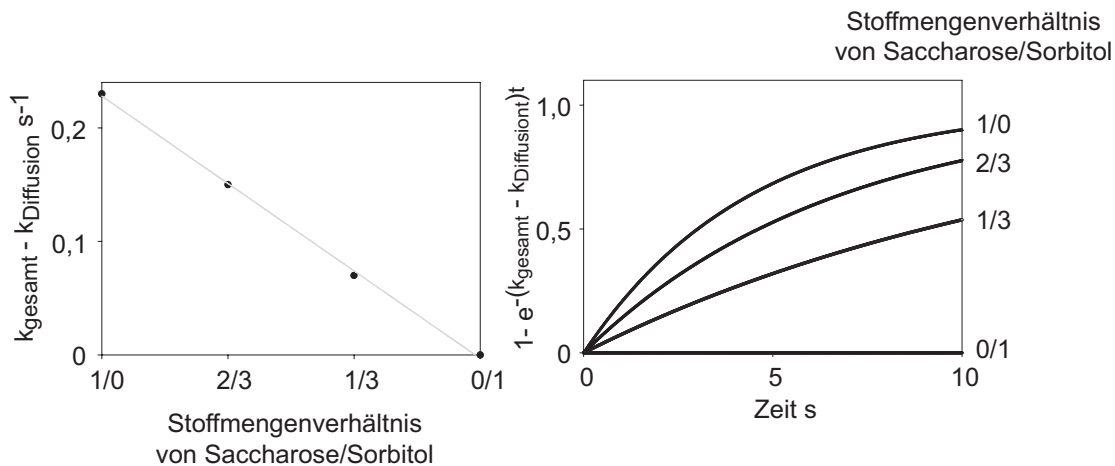


Abbildung 4.44: Konzentrationsabhängige Hemmung der reinen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP mit Sorbitol

4.3.3 Vergleich der Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten

Bisher wurde die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP-Protoplasten in der Saccharose-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung nachgewiesen und die Hemmung der Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP mit Sorbitol bestätigt. Bei EcGlpF wurde dagegen keine Wasser-Leitfähigkeit in diesem Testsystem gezeigt, unabhängig von den eingesetzten Osmolyten.

Als typische Aquaglyceroporine wurde eine hohe Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF bereits in verschiedenen Testsystemen [79, 82, 123] nachgewiesen. Allerdings gab es bisher keinen direkten Vergleich von den beiden Aquaglyceroporinen in einem Testsystem unter den verschiedenen Testbedingungen (z. B. den eingesetzten Osmolyten). Es ist hoch spannend, ob die Glycerol-Leitfähigkeit von

4 Ergebnisse

den beiden Aquaglyceroporinen in diesem Protoplasten-basierten Testsystem auch messbar ist und besonders ob deren Glycerol-Leitfähigkeit vor allem PfAQP eventuell durch die eingesetzten Osmolyte im Testsystem beeinflusst werden kann.

Dazu wurden die Protoplasten mit PfAQP, EcGlpF sowie Negativkontrolle (Leerplasmid) jeweils im Saccharose-, Sorbitol- und PEG 300-basierten Puffersystem präpariert (1,2 M Osmolyt). Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde bei diesem Test ein Glycerol-haltiger isoosmotischer Testpuffer (0,6 M Glycerol + 0,6 M Osmolyt) eingesetzt, somit lag nach dem 1:1 Mischen mit der präparierten Protoplasten-Suspension in der Stopped-Flow-Apparatur ein einwärts gerichteter chemischer Gradient von 300 mM Glycerol im Testsystem vor. Der Einstrom von Glycerol durch Aquaglyceroporine und die anschließende Wasserzufuhr führte zur Protoplasten-Schwellung und Abnahme der Lichtstreuung.

Unabhängig von den eingesetzten Osmolyten im Testsystem zeigte EcGlpF ähnliche Glycerol-Leitfähigkeit (s. Abb. 4.45) mit den k -Werten bei $0,05 \text{ s}^{-1}$ (s. Tab. 4.10). Bei PfAQP war dagegen eine deutlich abgeschwächte Glycerol-Leitfähigkeit im Sorbitol- bzw. im PEG 300-basierten Testsystem im Vergleich zu der im Saccharose-basierten Testsystem zu beobachten (s. Abb. 4.45). Ein direkter Vergleich von k_{Gly} -Werten zwischen EcGlpF und PfAQP deutete darauf hin, dass die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP um Faktor 1,5fach schneller als die von EcGlpF im Saccharose-basierten Testsystem, jedoch im Sorbitol- bzw. PEG 300-basierten Testsystem waren die k_{Gly} -Werte sogar um Faktor 2 langsamer als die von EcGlpF. Die Negativkontrolle zeigte keine erkennbare Glycerol-Leitfähigkeit bei dieser Messung. Damit konnte festgestellt werden, dass dieses Protoplasten-basierte Testsystem für die Glycerol-Leitfähigkeitsmessung von den beiden Aquaglyceroporinen geeignet war und allerdings die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP durch die eingesetzten Osmolyte beeinflusst werden konnte. Übrigens wurde die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP im Sorbitol-basierten Testsystem nicht wie Wasser-Leitfähigkeitsmessung komplett gehemmt, sondern nur zum Teil abgeschwächt.

Tabelle 4.10: Vergleich der Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in verschiedenen Osmolyten. Die Standardfehler der Mittelwerte sind angegeben ($n = 3$). (n. d.: nicht detektierbar)

Osmolyt	Negativkontrolle $k_{\text{Gly}} \text{ s}^{-1}$	PfAQP $k_{\text{Gly}} \text{ s}^{-1}$	EcGlpF $k_{\text{Gly}} \text{ s}^{-1}$
Saccharose	n. d.	$0,066 \pm 0,003$	$0,049 \pm 0,007$
Sorbitol	n. d.	$0,024 \pm 0,004$	$0,049 \pm 0,009$
PEG 300	n. d.	$0,026 \pm 0,007$	$0,053 \pm 0,007$

4.3 Untersuchung des ungewöhnlichen Aquaglyceroporins aus *P. falciparum*

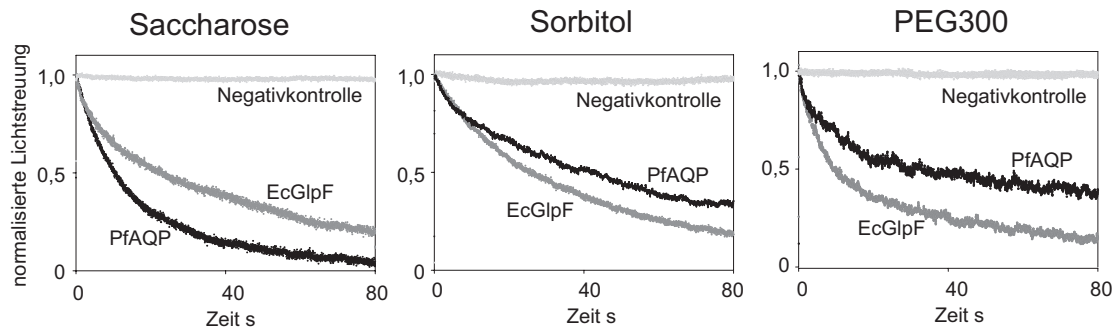


Abbildung 4.45: Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF im Saccharose-, Sorbitol- und PEG 300-basierten Testsystem (grau: Negativkontrolle, dunkelgrau: EcGlpF, schwarz: PfAQP)

4.3.4 Untersuchung der gemischten Solut-Leitfähigkeit von PfAQP

Unter den physiologischen Bedingungen liegen Aqua(glycero)porine fast immer in einer Lipiddoppelschicht vor, deren beiden Seiten von den hydrophilen Flüssigkeiten (besteht aus verschiedenen löslichen Bestandteilen (Soluten)) umgeben sind. Ob die Solut-Leitfähigkeit von den Aquaglyceroporinen eventuell durch diese vielfältige Zusammensetzung gegenseitig beeinflusst werden kann, ist bisher noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein einfachstes Modell ausgearbeitet und untersucht, nämlich die gemischte Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit von PfAQP, da einerseits Glycerol und Harnstoff häufig in den Physiologischen Lösungen vorkommen und normalerweise ihre Konzentrationen im millimolaren Bereich liegen [126, 127], andererseits eine hohe Glycerol- und Harnstoff-Leitfähigkeit von PfAQP bereits in einigen Experimenten nachgewiesen wurden [77, 79].

Aufgrund der vorherigen Erkenntnisse wurde die Bestimmung der gemischten Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit in einem Saccharose-basierten Testsystem durchgeführt. Für die Solut-Leitfähigkeitsmessung stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- ein isoosmotisches Testsystem mit dem Soluteinstrom und der anschließende Wasserzufuhr
- ein hyperosmotisches Testsystem zusammen mit der Beteiligung vom Wasserausstrom und Soluteinstrom

In dieser Arbeit wurden die Messungen mit den beiden Testsystemen durchgeführt und im Anschluss miteinander verglichen.

Beim ersten Testsystem wurden die im Saccharose-basierten Puffersystem präparierten PfAQP-Protoplasten (1,2 M Saccharose) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 mit einem isoosmotischen Testpuffer (0,6 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Mischung (Stoffmengenverhältnis von Glycerol/Harnstoff: 0/1, 1/4, 1/2, 3/4, 1/0)) gemischt. Der damit gebildete einwärts gerichtete chemische Gradient (300 mM Solut) und die anschließende Wasserzufuhr führten in der Tat zur Schwellung von den Protoplasten (s. Abb. 4.46). Alle Schwellungskurven zeigten einen ähnlichen Verlauf und die berechneten τ -Werte lagen zwischen 12-17 s, was auf die gemischte Solut-Leitfähigkeit unbeeinflusst von der Zusammensetzung der Solute hindeutete.

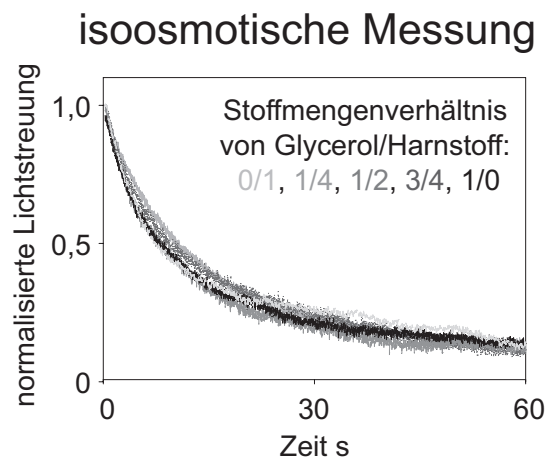


Abbildung 4.46: Messung der gemischten Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit von PfAQP im Saccharose-basierten isoosmotischen Testsystem. Ein einwärts gerichteter chemischer Gradient (300 mM Solut) führte zur Schwellung von Protoplasten. Die verschiedenen Stoffmengenverhältnisse von Glycerol/Harnstoff-Mischung wurden mit verschiedenen Graustufen dargestellt.

Beim zweiten Testsystem wurden die gleich im Saccharose-basierten Puffersystem präparierten PfAQP-Protoplasten (1,2 M Saccharose) in der Stopped-Flow-Apparatur 1:1 mit einem hyperosmotischen Testpuffer (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Mischung (Stoffmengenverhältnis von Glycerol/Harnstoff: 0/1, 1/4, 1/2, 3/4, 1/0)) gemischt. Es entstanden somit gleichzeitig ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient (300 mOsm/l) und ein einwärts gerichteter chemischer Gradient (300 mM Solut). Aufgrund der sehr hohen Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP schrumpften die Protoplasten zuerst und anschließend kam der Soluteinstrom. Eine typische zweiphasige Kurve wurde gezeigt (s. Abb. 4.47).

Die Zusammensetzung der Glycerol/Harnstoff-Mischung zeigte bei diesem Test großen Einfluss auf die gesamte Volumenänderung von Protoplasten und die Solut-Leitfähigkeit (s. Abb. 4.47). Bei der Messung mit 300 mM Glycerol als Solut

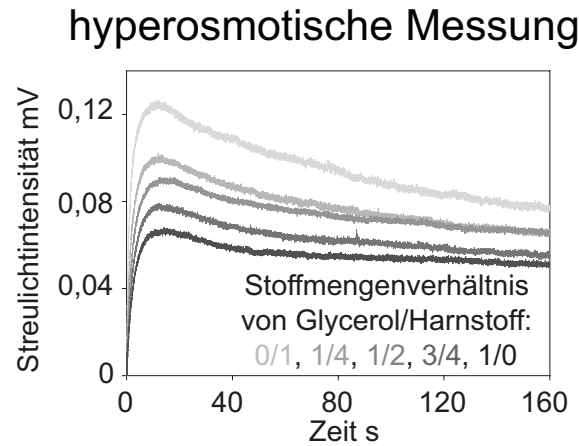


Abbildung 4.47: Messung der gemischten Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit von PfAQP im Saccharose-basierten hyperosmotischen Testsystem. Ein auswärts gerichteter Osmotischer (300 mOsm/l) und einwärts gerichteter chemischer (300 mM) Gradient führten zu einer zweiphasigen Kurvenverlauf. Die verschiedenen Stoffmengenverhältnisse von Glycerol/Harnstoff-Mischung wurden mit verschiedenen Graustufen dargestellt.

(Stoffmengenverhältnis von Glycerol/Harnstoff: 1:0) war die kleinste gesamte Volumenänderung zu sehen. Mit der Zunahme vom Harnstoff-Anteil im Solut stieg auch die gesamte Volumenänderung. Durch ein Kurvenfitting mit der Bateman-Funktion (s. Gl. 3.8) wurden die Ratenkonstanten (k_{Wasser} und k_{Solut}) sowie die Amplituden für den Wasseraustrastrom und Soluteinstrom (a und c) ermittelt (s. Tab. 4.11).

Tabelle 4.11: Vergleich der Amplitude und Leitfähigkeit vom Wasseraustrastrom und Soluteinstrom bei der hyperosmotischen Testbedingung mit den gemischten Soluten (300 mM Glycerol/Harnstoff-Mischung)

Stoffmengenverhältnis von Glycerol/Harnstoff	Amplitude für Wasseraustrastrom a	k_{Wasser} s^{-1}	Amplitude für Soluteinstrom c	k_{Solut} s^{-1}
0/1	0,071	0,305	0,061	0,013
1/4	0,063	0,290	0,043	0,015
1/2	0,065	0,280	0,030	0,016
3/4	0,055	0,280	0,025	0,017
1/0	0,052	0,290	0,017	0,021

Die Ratenkonstante der Wasser-Leitfähigkeit lag unbeeinflusst vom Mischungsverhältnis der Glycerol und Harnstoff zwischen $0,28 \text{ s}^{-1}$ und $0,30 \text{ s}^{-1}$ und war deut-

4 Ergebnisse

lich größer (ca. 20fach) als die gesamte Solut-Leitfähigkeit (Glycerol/Harnstoff-Mischung). Die Ratenkonstante für die gesamte Solut-Leitfähigkeit nahm mit der steigenden Harnstoff-Anteile im gemischten Solut ab und gleichzeitig steig die Amplitude für den Soluteinstrom (s. Abb. 4.48).

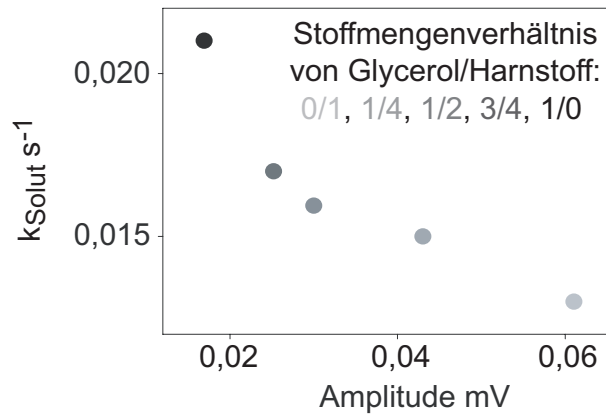


Abbildung 4.48: Änderung der Ratenkonstante der Solut-Leitfähigkeit und Amplitude für den Soluteinstrom durch die verschiedenen Stoffmengenverhältnisse von Glycerol/Harnstoff bei der hyperosmotischen Testbedingung. Die verschiedenen Stoffmengenverhältnisse von Glycerol/Harnstoff-Mischung wurden mit verschiedenen Graustufen dargestellt.

Unter diesen Testbedingungen wurde eine größere Glycerol-Leitfähigkeit als Harnstoff-Leitfähigkeit gezeigt. Bei diesem hyperosmotischen Testsystem waren die Wassermoleküle und die Solutmoleküle innerhalb des Kanalbereiches in der Gegenrichtung gelaufen. Es schien, Glycerol besser als Harnstoff an dieser Situation anzupassen. Wegen des schnellen Glyceroleinstroms konnte die Volumenänderung von Protoplasten schnell kompensiert werden und war auch eine kleine gesamte Volumenänderung (Amplitude) zu beobachten.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der Aquaporin-Arsenatreduktase-Fusionsproteine Strop634 und Strop1447 aus *S. tropica*

5.1.1 Physiologische Funktion von Strop634

Aquaporine sind uralte Kanalproteine, die aufgrund ihrer starken Sequenzähnlichkeit der beiden Aquaporinhälfte ursprünglich aus einer Genduplikation entstanden sein könnten [16]. Durch weitere Mutationen auf der Gen-Ebene besonders in den selektiven Filterregionen führt es zur funktionellen Aufteilung dieser Familie: wasserspezifische orthodoxe Aquaporine und Solut-leitende Aquaglyceroporine [119].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein funktionelles Aquaporin-Arsenatreduktase-Fusionsprotein (Strop634) aus *S. tropica* charakterisiert, das wahrscheinlich eine nächste Evolutionsstufe eines Aquaglyceroporins für eine spezielle physiologische Funktion (Arsenat-Detoxifikation) darstellt.

Die Topologie- und Struktur-Vorhersage (s. Abb. 5.1) von Strop634 zeigte einen Durchmesser von $\sim 25 \text{ \AA}$ bei der Aquaporin-Domäne, die zusammen mit dem Linker und der Arsenatreduktase-Domäne eine „geschlossene Tasche“ für das gebildete Arsenit dargestellt werden kann.

Die Aquaporin-Domäne ist arsenitselektiv und zusammen mit der Arsenatreduktase-Domäne ist das ganze Fusionsprotein direkt an der Arsenat-Detoxifikation beteiligt (s. Abb. 5.2). Ein weiteres Beispiel für solche Kanal-Enzym-Fusionsproteine bei der Arsenat-Detoxifikation ist Rv2634 in *Mycobacterium tuberculosis*. Bei dem liegt ein Arsenittransporter als Kanal-Domäne mit ebenfalls einer Arsenatreduktase-Domäne (gekoppelt mit Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System) in einer fusionierten Form vor (s. Abb. 5.2).

Ein strop634-ähnliches Gen wurde ebenfalls im Genom von einer Frankia-Spezies *Frankia alni* entdeckt, dessen Proteinsequenz Fraal3366 als ein Fusionsprotein

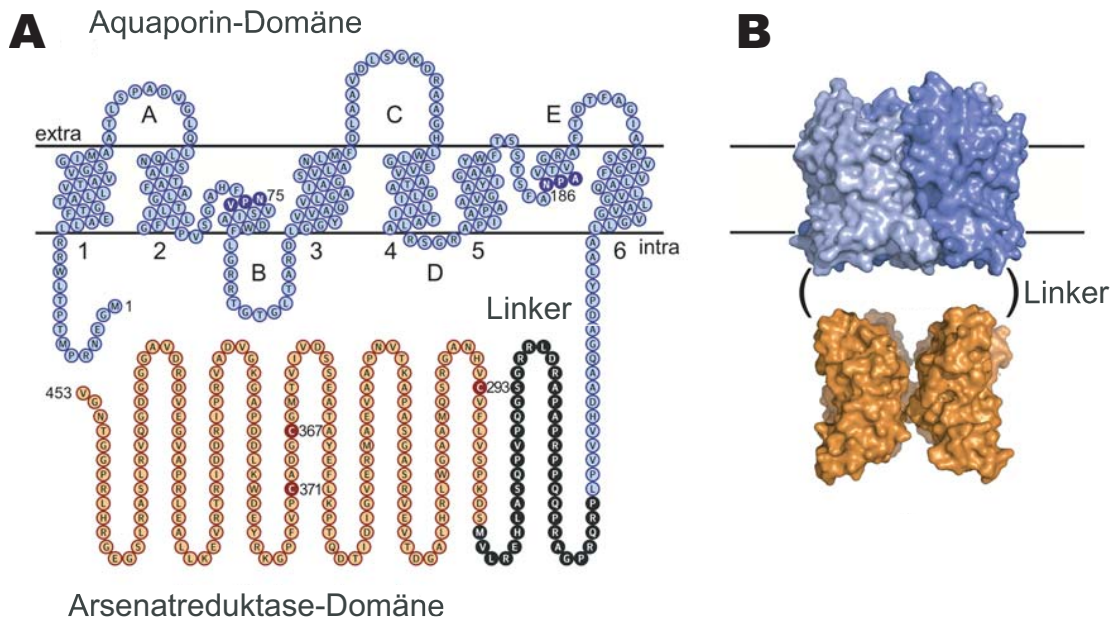


Abbildung 5.1: **A:** Topologie-Vorhersage von Strop634. Dunkelblau gezeichnet sind die beiden NPA-Motive. Die Arsenatreduktase-Domäne beginnt mit M283. Das putative Aktivzentrum für die Arsenatreduktase sind rot markiert. (Diese Grafik wurde mit dem TeXtopo Softwarepaket erstellt [128].) **B:** Struktur-Vorhersage von Strop634 und Größenvergleich der Aquaporin-Domäne und Arsenatreduktase-Domäne. (Die Vorhersage beruht auf der Kristallstruktur von Aquaglyceroporin EcGlpF (nach PDB 1FX8) und Arsenatreduktase EcArsC (nach PDB 1J9B).)

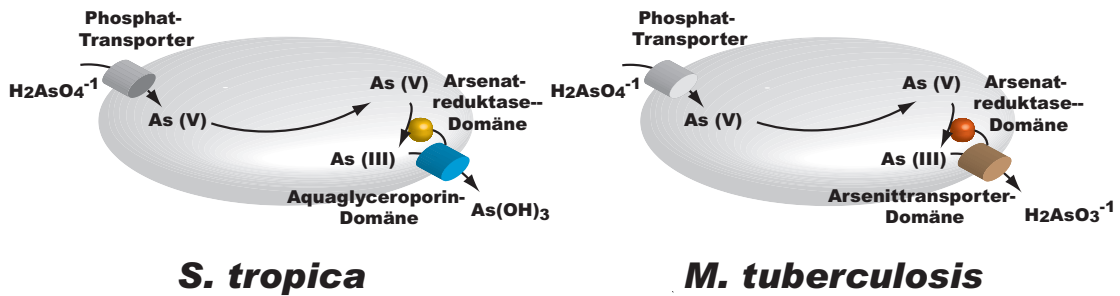


Abbildung 5.2: Funktionsmechanismen von Strop634 in *S. tropica* und Rv2634 in *M. tuberculosis* bei der Arsenat-Detoxifikation in Zellen

in der gleichen Weise aus einer Aquaporin-Domäne und einer Arsenatreduktase-Domäne besteht. Interessanterweise bei einem zu *F. alni* sehr verwandten Frankia-Stamm *Frankia* sp. CcI3 wurden zwei Gene (Franci3_2325 und _2326) in einem Gencluster gefunden, welche sich mit einer GTGA-Sequenz überlappen. Die

5.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

GTGA-Sequenz kann einerseits als ein Stop-Codon (TGA) für das vorne liegende Aquaporin-Gen dienen, andererseits aber auch als ein Start-Codon (GTG) für das nächste Arsenatreduktase-Gen funktionieren. Solche sich überlappende Sequenz weist eine hohe Anfälligkeit für eine Genfusion auf. Durch ein einziges Frameshift lassen sich die beiden Gene in einen offenen Leserahmen entstehen. Der unterschiedliche Aufbau (getrennte und fusionierte Form) von Aquaporin-Gen und Arsenatreduktase-Gen in einem Genkomplex in zwei Bakterien-Spezies aus einer Gattung weist darauf hin, dass solche Fusionsereignis kürzlich in der ganzen Evolutionsgeschichte geschah.

Laut Darwin's klassischer Evolutionstheorie werden die durch Mutationen entstehenden vorteilhaften Merkmale einer Spezies durch die natürliche Selektion weiter erhalten, z. B. sind die neuen Merkmale besser an die Umwelt (z. B. bei einer Arsenat-haltigen Umgebung) angepasst, kommen die betreffenden Organismen zur Fortpflanzung [129]. Während der Evolution versuchen alle Organismen immer ökonomischer und effizienter, Energie zu gewinnen und sie zu nutzen, um den Selektionsdruck zu überwinden [130].

Die Kanal-Enzym-Fusionsproteine als eine multifunktionelle Sonderform von Membranproteinen und zytoplasmatischen Enzymen scheinen wegen der zunehmenden entschlüsselten Genomprojekte immer mehr zu werden [102]. Sie können sich an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligen, z. B. an Signaltransduktion bei TRPM7 [131, 132] und TRPM2 [133] oder metabolische Kompartimentierung [134].

Es bleibt immer noch die Frage, warum die Natur solche Kanal-Enzym-Fusionsproteine schafft und diese Art von Proteinen unter dem Selektionsdruck immer noch vorbehalten werden kann. Hier wurden die möglichen Vorteile von diesen Kanal-Enzym-Fusionsproteinen vor allem in Bezug auf Strop634 spekuliert.

- Die Arsenat-Detoxifikation ist ein Sonderfall der Entgiftungsmechanismen in Organismen. Normalerweise werden toxische Stoffe zuerst zu weniger toxischen Substanzen metabolisiert und anschließend aus dem Zytosol transportiert [135]. Bei der Arsenat-Detoxifikation wird hingegen aus Arsenat das noch toxischere Arsenit durch normalerweise eine zytosolische Arsenatreduktase gebildet. Es ist selbstverständlich vorteilhaft, wenn das durch die Reduktion entstandene Arsenit mittels entsprechender Kanäle (Arsenit-leitende Aquaglyceroporine oder Arsenittransporter) sofort aus dem Zytosol entfernt werden kann.

Mit der Kanal-Enzym-Konstruktion von Strop634 kann das lokal gebildete Arsenit aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten durch das arsenitselektive Aquaglyceroporin ausgeschieden werden, damit vermeidet es di-

5 Diskussion

rekt, die Arsenit-Konzentration im Zytosol anzusteigen und die sämtlichen Wechselwirkungen mit anderen wichtigen Enzymen wie Thioredoxinreduktase hervorzurufen (s. Abb. 5.3). In der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Hemmung der StTrxR (Thioredoxinreduktase aus *S. tropica*) durch Arsenit gezeigt, im Vergleich zur Hemmung der Strop634-Arsenatreduktase-Domäne durch Arsenit ist die inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für StTrxR um faktor 15 gesunken (s. Abb. 4.11 und 4.14). Es deutet darauf hin, dass dessen eigene Thioredoxinreduktase sehr anfällig gegen Arsenit ist, dies erklärt auch, warum der Enzymaktivitätstest der Arsenatreduktase-Domäne von Strop-634 mit dem eigenen StTrx-StTrxR-System nicht direkt funktioniert hat. Mit dieser fusionierten Form können solche gegen Arsenit instabilen Enzyme geschützt werden. Ein ähnlicher metabolischer Schutzmechanismus wurde auch bei einigen Multienzymkomplexen entdeckt, wie Tryptophan-Synthase [134] und Carbamoylphosphat-Synthetase [136] aus *E. coli*, bei denen die zu den Komplexen gehörenden unterschiedlichen Enzymuntereinheiten durch einen Proteinkanal gebunden sind. Diese Konstruktion ermöglicht einerseits eine effiziente Synthese einiger natürlicher Stoffwechselprodukte, verhindert andererseits auch die möglichen Interaktionen von Zwischenprodukten mit anderen Stoffen im Zytosol.

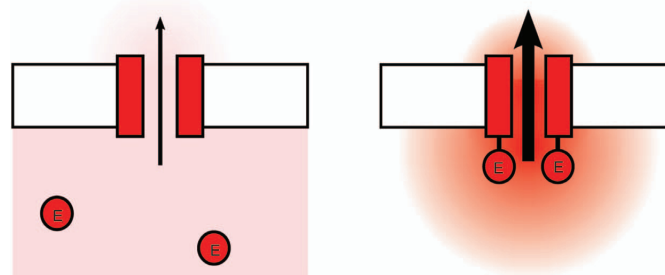


Abbildung 5.3: Darstellung der Ausscheidung eines Metaboliten (rot) durch den Kanal nach dem Konzentrationsgradienten. Bei der getrennten Form (Enzym + Kanalprotein) ist ein Verteilungsprozess vom Metaboliten im Zytosol erforderlich, bis der Metabolit den Kanal erreicht (links). Bei der fusionierten Form (Enzym-Kanalprotein) wird eine hohe Konzentration vom Metaboliten (tiefrot) beim Kanalprotein erzeugt und anschließend erfolgt die Ausscheidung durch den Kanal nach dem Konzentrationsgradienten (rechts).

- Der Diffusionsprozess im Zytosol ist stark eingeschränkt wegen der hohen Protein-Konzentration (200-300 mg/ml) [137] im Zytosol. Nach dem Ersten Fick'schen Gesetz (s. Gl. 5.1) ist der Teilchenstromfluss J direkt proportional zum Konzentrationsgradienten entgegen der Diffusionsrichtung $\partial c / \partial x$. Die Proportionalitätskonstante ist der Diffusionskoeffizient D . Nach der Stokes-

5.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

Einstein-Beziehung ist der Diffusionskoeffizient D für die Moleküle im Zytosol um Faktor 4 langsamer als im normalen wässrigen Medium [138].

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (5.1)$$

Der Diffusionsprozess führt zu einer Entropieerhöhung (S) im System. Durch die Gleichung von der freien Energie (s. Gl. 5.2) steigt die gesamte freie Energie F , wenn weniger Diffusionsprozesse im System erforderlich sind bzw. die Entropie weniger steigt.

$$F = U - TS \quad (5.2)$$

Durch diese Konstruktion von Kanal-Enzym-Fusionsproteinen können die Diffusionswege von Molekülen zwischen den Enzymen und Zielkanälen (oder den Kanälen und Zielenzymen) enorm reduziert werden, damit ist dieser Prozess energieeffizienter und steht mehr freie Energie im System zur Verfügung. Diese Konstruktion ist auch bei einigen Ionenkanal-Enzym-Fusionsproteinen zu finden, z. B. die Ionenkanäle mit unterschiedlichen Enzym-Domänen wie ADP-Ribase (TRPM2) [139], Kinase (TRPM7) [140] oder Adenylatcyclase [141]. Es ist plausibel, dass mit solchen fusionierten Kanal-Enzym-Proteinen die Energieeffizienz für den entsprechenden Prozess (Metabolisierung, Signal-Transduktion) steigt.

5.1.2 Mögliche physiologische Funktion von Strop1447

Strop1447 zeigt eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu Strop634, aber in dem ersten Teil dieser Arbeit wiesen weder Aquaporin-Domäne noch Arsenatreduktase-Domäne eine Funktionalität auf (*in vitro* und *in vivo*). Es wurde vermutet, dass es sich bei Strop1447 ausschließlich um ein Pseudogen handelt. Allerdings wurde im Western Blot die vollständige Expression von Strop1447 in der mikrosomalen Fraktion von *S. tropica* nachgewiesen (s. Abb. 4.27). Es bleibt immer noch die Frage, warum Strop1447 trotz der fehlenden Funktionen noch in *S. tropica* exprimiert ist, oder ob es bei Strop1447 einen anderen Funktionsmechanismus geben kann.

Die phänotypische Untersuchung der verschiedenen Knockout-Stämme von *S. tropica* (s. Abb. 4.28) zeigte, dass Strop1447 zum Teil die fehlende Arsenatreduktase-Funktion vom Knockout-Stamm Δ Strop634-arsC-D kompensieren konnte, was auf

5 Diskussion

die Reduktase-Aktivität von Strop1447 in *S. tropica* hindeutete. Die Arsenit-leitende Kanalfunktion von Strop1447 konnte weiterhin nicht nachgewiesen werden.

Vor kurzem wurde eine neue Arsenatreduktase-Familie entdeckt [69]. Die bisher charakterisierten zwei Repräsentanten aus dieser Familie CgArsC1 und CgArsC2 stammen aus *C. glutamincum*, ein grampositives Bakterium aus der Klasse Actinobacteria. Die beiden Arsenatreduktasen benutzen das in dieser Bakterien-Klasse speziell vorkommende Mycothiol/Mycoredoxin/Mycothionreduktase-System (MSH/Mrx/MR-System). Das System ist ausschließlich in Actinobacteria zu finden [70] und hat eine analoge Funktion zum Glutathion/Glutaredoxin/Glutathionreduktase-System (GSH/Grx/GR-System). Der Proteinsequenzvergleich der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 mit den beiden CgArsC1 und CgArsC2 zeigte eine gewisse Abweichung, aber die Stammbaumanalyse (s. Abb. 4.2), vor allem Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 und CgArsC1, wies eine mögliche phylogenetische Verwandtschaft auf. Bei diesen drei Arsenatreduktasen gibt es ein einziges Cystein in ihren Proteinsequenzen (C11(284) bei Strop1447, C8 bei CgArsC1, C11 bei CgArsC2), was als das Aktivzentrum essentiell für die Arsenatreduktion in dieser Familie sein soll.

In verschiedenen *Salinispora*-Spezies wurde die Produktion von Mycothiol bereits nachgewiesen [142]. Im Genom von *S. tropica* wurden ebenfalls einige putative Gene für die Mycothiol-Synthese (mshA, strop331; mshB, strop3763; mshC, strop2168 und mshD, strop291), die Mycothionreduktase (strop3319) und den entsprechenden Cofaktor Mycoredoxin (strop3740) gefunden. Hier wurde vermutet, dass die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 wie CgArsC1 und CgArsC2 bei dem Reduktionsprozess das MSH/Mrx/MR-System verwendet. Es erklärt auch damit, dass wegen des fehlenden MSH/Mrx/MR-systems die Arsenatreduktase-Aktivität von Strop1447 *in vitro* und *in vivo* von *S. cerevisiae* und *E. coli* nicht nachgewiesen werden konnte.

Unter den physiologischen Bedingungen sind Aquaporine als Tetramer zu sehen. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten der Aquaporin-Domäne von Strop634 und Strop1447 ist hier eine Bildung von einem Heterotetramer sehr wahrscheinlich (s. Abb. 5.4). Das Vorliegen zweier funktioneller Aquaporin-Domänen (Strop634-AQP-D) im Tetramer soll auch für den Efflux für das gebildete Arsenit ausreichend sein, wegen des kleinen K_{cat} -Werts von den Arsenatreduktase-Domänen. Es kann aber auch sein, dass Strop634 und Strop1447 jeweils als Homotetramer in den Zellen vorliegen, wobei Strop634 für die Arsenatreduktion und Arsenit-Ausscheidung zuständig ist und Strop1447 nur für die Arsenatreduktion.

5.1 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *S. tropica*

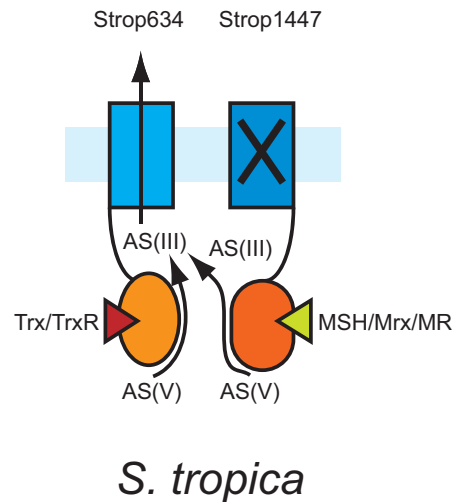


Abbildung 5.4: Darstellung des putativen Heterotetramers aus Strop634 und Strop1447. An der Arsenatreduktion sind jeweils Trx/TrxR-System und MSH/Mrx/MR-System für Strop634 und Strop1447 beteiligt.

5.1.3 Ausblick

- Strop1447 wies eine potentielle Arsenatreduktase-Aktivität im phänotypischen Assay bei *S. tropica* auf. Es wurde vermutet, dass das MSH/Mrx/MR-System sich an der Arsenatreduktion beteiligt. Die putativen Gene für Mrx und MR wurden bereits festgestellt. Mit einer weiteren Subklonierung und heterolog Expression von den beiden putativen Genen und Proteinen sowie Affinitätsaufreinigung von Mycothiol aus dem Zellextrakt könnte die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 *in vitro* untersucht werden.
- Die Proteinsequenz der Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 und Strop1447 wies starke Ähnlichkeit auf. Die enzymatischen Eigenschaften waren allerdings sehr unterschiedlich, z. B. für die Reduktion ist die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 mit dem Trx/TrxR-System gekoppelt, die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 dagegen möglicherweise mit dem MSH/Mrx/MR-System gebunden; die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 hat neben der Arsenatreduktase-Aktivität auch eine Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität, diese Enzymaktivität kann bei der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Die Arsenatreduktase-Domäne von Strop634 hat drei Cysteine in ihrer Proteinsequenz, die typischerweise als das Aktivzentrum für diese Enzymklasse dienen. Die Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 hat ausschließlich ein einziges Cystein, was für die grampositiven Bakterien untypisch ist. Es ist denkbar, ande-

re zwei Cysteine durch eine *in vitro* Mutagenese in bestimmten Positionen der Arsenatreduktase-Domäne von Strop1447 einzufügen und im Anschluss dessen Enzymaktivitäten zu überprüfen.

5.2 Untersuchung der Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine TgAQP2 und EtAQP2 aus *T. gondii* und *E. tenella*

5.2.1 Charakterisierung der TgAQP2 und EtAQP2

TgAQP2 und EtAQP2 als Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine sind strukturell ungewöhnlich im Vergleich zu den typischen Aquaporinen. Mit dieser Konstruktion können sie eventuell ein Homodimer bilden, während die meisten Aquaporine in der Membran als Homotetramere vorliegen, mit der Ausnahme, dass einige pflanzliche Aquaporine sich zu Heterotetrameren aus verschiedenen Isoform zusammenlagern [143, 144]. Diese putative Dimer-Form kann möglicherweise die Struktur der Zentralpore so beeinflussen, dass die Zentralpore neue Eigenschaften (Funktionen) erhalten könnte. Die Funktionen der Zentralpore (auch als 5. Pore genannt) für die Aquaporine sind bisher noch umstritten. Die meisten sind der Meinung, dass die Zentralpore keine Funktionen hat. In einigen Arbeiten wurde jedoch die Leitfähigkeit von einigen Gasen (CO₂, O₂, NO) [13, 145] und sogar Ionen [146] durch die Zentralpore nachgewiesen und theoretisch simuliert.

Der Sequenzvergleich und die Stammbaumanalyse von TgAQP2 und EtAQP2 wiesen ebenfalls einige Besonderheiten auf. Einerseits gehörten sie nicht direkt zu den typischen Aquaporin-Subfamilien (orthodoxe Aquaporine und Aquaglyceropore) (s. Abb. 4.29), andererseits sind deren beiden Filterregionen (NPA- und ar/R-Region), vor allem die ar/R-Region, ganz anders aufgebaut (s. Tab. 4.7) im Vergleich zu den normalen Aquaporinen.

Aufgrund der vielen Ungewöhnlichkeiten von TgAQP2 und EtAQP2 wurden im Rahmen dieser Arbeit TgAQP2 und EtAQP2 sowie ihre jeweiligen Aquaporin-Domänen subkloniert und zum Teil charakterisiert. Alle subklonierten Gene (Fusionsgene und jeweilige Aquaporin-Domänen) zeigten vollständige Expression in *S. cerevisiae* (s. Abb. 4.31). Die phänotypischen Assays wiesen aber keine direkte Ammoniak- und Kalium-Leitfähigkeit auf. Nur TgAQP2 konnte bei dem Methylamin-/Methylammonium-Aufnahme-Assay eine Methylamin-Leitfähigkeit zeigen, was auf die Lokalisation von TgAQP2 möglicherweise in Vakuolenmembran der Hefezellen hinwies (s. Abb. 4.34). Die dynamische Lichtstreuungsmessung mit

5.2 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaporine aus *T. gondii* und *E. tenella*

der Stopped-Flow-Apparatur zeigte ebenfalls keine Wasser-Leitfähigkeit für alle zu untersuchenden Aquaporine (Fusionsproteine und jeweilige Aquaporin-Domänen). Allerdings wurde eine schwache Glycerol-Leitfähigkeit bei den Fusionsproteinen (TgAQP2, EtAQP2) und einer von beiden Domänen (TgAQP2b, EtAQP2b) beobachtet.

5.2.2 Ausblick

- In Rahmen dieser Arbeit wurden TgAQP2 und EtAQP2 in den verschiedenen Hefezellen-basierten Testsystemen charakterisiert. Die zu untersuchenden Aquaporine (Fusionsproteine und jeweilige Domänen) zeigten keine bzw. schwache Leitfähigkeit für einige Solute. Die ursprüngliche Idee dieser Arbeit war die Zentralspore zu charakterisieren, z. B. die Gas-Leitfähigkeit. Dazu sind einige geeignete Testverfahren zu überlegen, z. B. einige pH-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe wie Carboxyfluorescein (CF) und Fluoresceinbisacetat (FBA) bei der Stopped-Flow-Messung einzusetzen, durch den Transport von einigen Gasen wie CO₂ kann der zytosolische pH-Wert geändert werden und die Transportrate kann durch eine dynamische Fluoreszenzmessung ermittelt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Leitfähigkeit der radioaktiv markierten Solute zu messen.
- Bisher wurden TgAQP2 und EtAQP2 als Aquaporin-Aquaporin-Fusionsproteine dargestellt. Da für die normalen Aquaporine die erste und zweite Hälfte starke Sequenzähnlichkeit aufweisen, ist es auch vorstellbar, dass die Helices in der Mitte 4-8 (s. Abb. 5.5) von TgAQP2 und EtAQP2 selbst ein Aquaporin bildet und die Reste als langer N- und C-Terminus dargestellt werden können. Allerdings wenn diese Konstruktion tatsächlich vorkommt, liegen der N- und C-Terminus extrazellulär vor, was auch sehr ungewöhnlich ist.
- *T. gondii* und *E. tenella* sind beide Eukaryoten. Für einige Aquaporine aus Eukaryoten sind co- sowie posttranslationale Modifikation wie z. B. spezielle Glykosylierungen für ihre Funktionalitäten wichtig. Es ist sinnvoll, die TgAQP2 und EtAQP2 in anderen Testsystemen wie *X. laevis* Oocyten zu exprimieren und zu untersuchen.

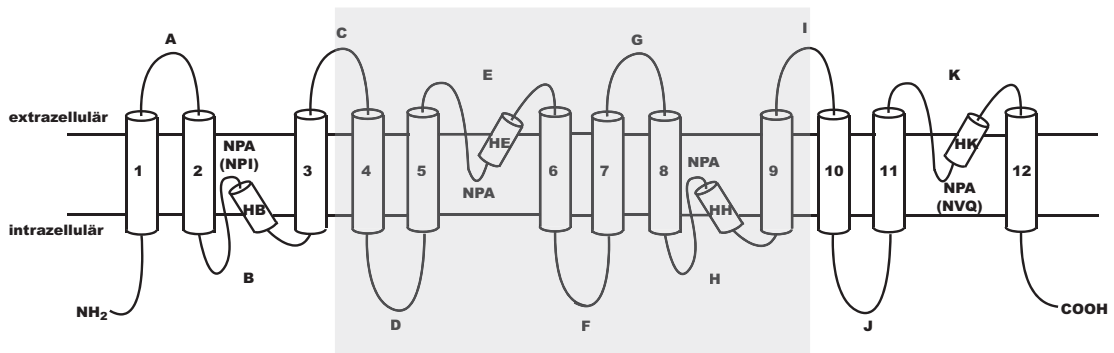


Abbildung 5.5: Darstellung der 12 transmembranären Helices von TgAQP2 und EtAQP2. Ein putatives Aquaporin-Aquaporin-Fusionsprotein sowie ein putatives Aquaporin aus Helices 4-9 mit langen N- und C-Terminus (grau markiert Kasten) sind abgebildet. Bei EtAQP2 sind vier NPA-Sequenzen in NPA-Region zu sehen. Bei TgAQP2 besteht die NPA-Region aus NPI, NPA, NPA, NVQ-Sequenzen.

5.3 Untersuchung und Charakterisierung von PfAQP in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung

5.3.1 Charakterisierung der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung

Omotischer Schwellungs- oder Schrumpfungstest ist neben der phänotypischen Untersuchung die häufigste eingesetzte Methode zur Charakterisierung der Aqua(glycero)porine [83], dazu werden die Wasser- und Solut-Leitfähigkeit durch eine Volumenänderungsrate bei einem Oocyten-Schwelltest oder einer (Protoplasten- oder Liposome-basierten) dynamischen Lichtstreuungsmessung ermittelt.

Die Aquaglyceroporine als eine wichtige Subfamilie von Aquaporinen haben normalerweise einen größeren Durchmesser in ihrem engsten Kanalbereich (ar/R-Region) als die orthodoxen Aquaporine, was den Transport von Soluten ermöglicht. Ob eine hohe Wasser-Leitfähigkeit bei den Aquaglyceroporinen z. B. EcGlpF und PfAQP auch vorhanden ist, ist bisher immer noch umstritten. Bei einigen Computersimulation-Studien wurde eine hohe Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF und PfAQP erwartet [121, 122]. Allerdings wurde in einem Oocyte-basierten Schwelltest [147] und einem Liposome-basierten dynamische Lichtstreuungsmessung [123] keine Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF gezeigt, bei einem anderen Liposome-basierte dynamische

5.3 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaglyceroporin aus *P. falciparum*

sche Lichtstreuungsmessung wurde ebenfalls eine schwache Wasser-Leitfähigkeit (15% der Wasser-Leitfähigkeit vom orthodoxen Aquaporin EcAQPZ) bestätigt [5]. Über die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP waren die Meinungen noch kontroverser, allein die experimentellen Messdaten waren noch nicht geeinigt. Bei einem Oocyte-basierten Schwelltest [30, 79] und einer Liposome-basierten Lichtstreuungsmessung mit Saccharose [81] wurde eine hohe Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP gezeigt, bei einer weiteren Protoplasten-basierten Lichtstreuungsmessung in Sorbitol konnte die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP nicht nachgewiesen werden [82].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung mit verschiedenen Osmolyten getestet und miteinander verglichen, um experimentell zu zeigen, wie die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von den beiden Aquaglyceroporinen tatsächlich in diesem Testsystem sind.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP stark von den eingesetzten Osmolyten abhängig waren. In einem Saccharose-basierten Testsystem wies PfAQP eine hohe Wasser-Leitfähigkeit auf, in einem anderen Sorbitol-basierten Testsystem wurde keine Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP gezeigt. Beim Einsatz von anderen Osmolyten in das Testsystem wie PEG 300 und Glycerol war die Wasser-Leitfähigkeit zum Teil abgeschwächt. Die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP war bei diesem Testsystem zu beobachten und waren allerdings ebenfalls von den eingesetzten Soluten abhängig, im Saccharose-basierten Testsystem zeigte PfAQP eine deutliche höhere Glycerol-Leitfähigkeit als die Werte in den Sorbitol- und PEG 300-basierten Testsystemen.

Der Hemmungseffekt auf die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP durch Sorbitol ist im Gegensatz zu typischen Hemmstoffen sehr mild. Ein sofortiges Mischen mit einem Sorbitol-haltigen Puffer in die Stopped-Flow-Apparatur zeigte keine direkte Hemmung. Erst nach der Inkubation oder Präparation im Sorbitol-haltigen Puffersystem konnte der Hemmungseffekt nachgewiesen werden (s. Abb. 4.42, 4.43, 4.44). Um den Hemmungseffekt zu erzielen sind auch ein großes Stoffmengenverhältnis von Sorbitol im Testsystem erforderlich.

Im Vergleich zu PfAQP wurden die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von EcGlpF nicht von den verwendeten Osmolyten im Testsystem beeinflusst. Es gab keine erkennbare Wasser-Leitfähigkeit von EcGlpF in dieser Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung. Die Glycerol-Leitfähigkeit von EcGlpF konnte dagegen bei diesem Testsystem nachgewiesen werden und in verschiedenen Osmolyten zeigten die Glycerol-Leitfähigkeit keine signifikanten Unterschiede.

In der Kristallstruktur von PfAQP [81] und EcGlpF [123] wurde ein fast identischer Aufbau der ar/R-Region gezeigt (s. Abb. 1.3). Die Konstruktion der weiteren Ami-

5 Diskussion

nosäurereste auf der Kanalseite ist auch beinahe gleich. Ein einziger Unterschied zwischen beiden befindet sich zwischen ar/R-Region und NPA-Region (Leu292 bei PfAQP und Met202 bei EcGlpF) [30]. Leucin und Methionin sind beide unpolare Aminosäuren mit ähnlicher Größe. Daher ist die gesamte Ladungsverteilung und der Durchmesser im Kanalbereich sehr ähnlich [81]. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von den beiden Aquaglyceroporinen sollten sich PfAQP und EcGlpF bei der Leitfähigkeitsmessung eigentlich ähnlich verhalten. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten aber ein deutlicher Hemmungseffekt auf die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP durch Sorbitol, aber nicht auf die beiden Leitfähigkeiten von EcGlpF.

Ein direkter Vergleich der Kristallstrukturen von PfAQP [81] und EcGlpF [123] zeigt, dass zwei Glycerolmoleküle mehr (insgesamt 5 Glycerolmoleküle) in der Kristallstruktur von PfAQP zu sehen sind als in EcGlpF (insgesamt 3 Glycerolmoleküle) (s. Abb. 5.6), obwohl der Kristallisationsprozess von den beiden unter gleichen Bedingungen (15% Glycerol) durchgeführt wurde.

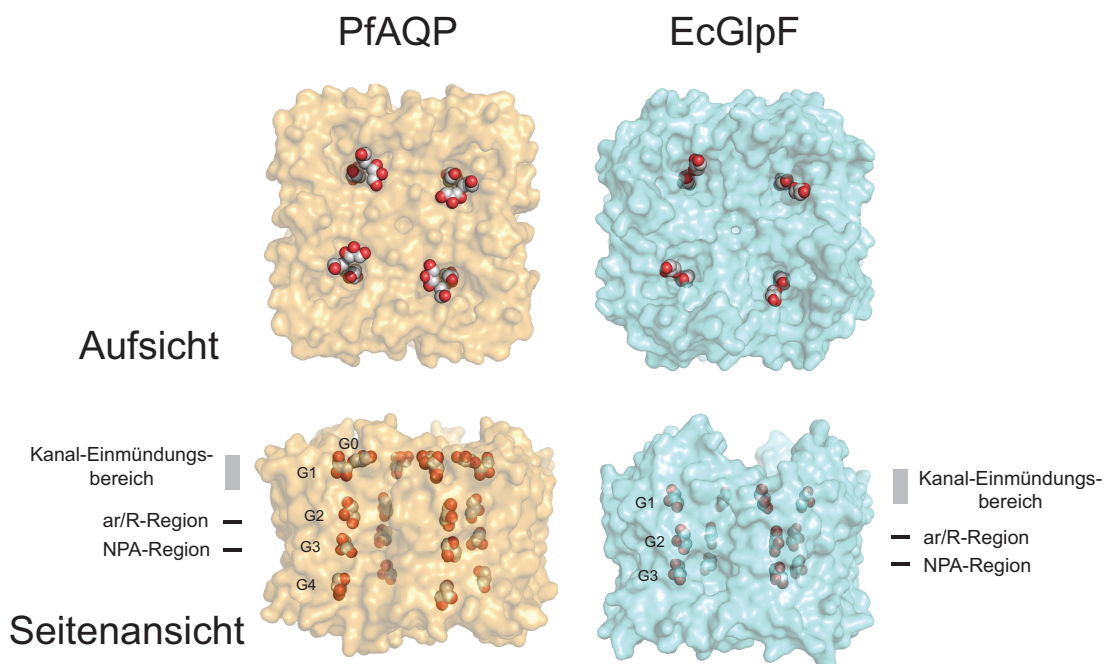


Abbildung 5.6: Aufsicht und Seitenansicht der Kristallstrukturen von PfAQP (nach PDB 3CO2) und EcGlpF (nach PDB 1FX8). Fünf bzw. drei Glycerolmoleküle sind jeweils in PfAQP und EcGlpF lokalisiert. Gekennzeichnet sind ebenfalls der extrazelluläre Kanaleintrittsbereich, ar/R-Region und die NPA-Region.

In den beiden Kristallstrukturen sind jeweils drei Glycerolmoleküle beim dem Kanalbereich lokalisiert. Das Erste (G1) befindet sich im extrazellulären Einmün-

5.3 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaglyceroporin aus *P. falciparum*

dungsbereich, das Zweite (G2) in der ar/R-Region und das Dritte (G3) in der NPA-Region. Die zwei zusätzlichen Glycerolmoleküle (G0 und G4) in der Kristallstruktur von PfAQP sind jeweils im extrazellulären und intrazellulären Einmündungsbereich des Kanals zu sehen, wobei G0 direkt neben G1 steht. Die hohe Anzahl von Glycerolmolekülen in Kristallstruktur von PfAQP weist eine allgemeine hohe Bindungsaffinität von PfAQP und Glycerol, besonders in den beiden Einmündungsbereichen, im Vergleich zu EcGlpF auf.

PEG 300 zeigte einen schwachen Hemmungseffekt sowohl auf die Wasser-Leitfähigkeit als auch auf die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP. Es wurde vermutet, dass PEG 300 als ein langkettiges Polyol (s. Abb. 5.7) zum Teil in den Aquaporin-Kanal von PfAQP eindringen kann. Wegen seiner zwei hydrophilen Hydroxylgruppen an den beiden Enden können die Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückbindungen) mit Aminosäuren der inneren Kanalseite hervorrufen, damit werden die beiden Leitfähigkeiten abgeschwächt.

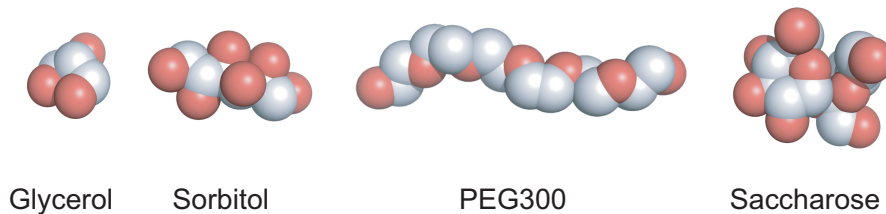


Abbildung 5.7: Struktur- und Größenvergleich der verwendeten Osmolyte in dieser Arbeit

Sorbitol als ein langkettiges Polyol (s. Abb. 5.7) ist theoretisch auch in der Lage, durch Aquaglyceroporine transportiert zu werden. Die Sorbitol-Leitfähigkeit von EcGlpF und PfAQP wurde bereits in der dynamische Lichtstreuungsmessung und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Spektroskopie nachgewiesen [123, 148], allerdings mit einem sehr geringen Leitfähigkeitskoeffizienten (ca. 1/20 der Glycerol-Leitfähigkeit). In unserer Protoplasten-basierten Stopped-Flow-Messung wurde aber keine detektierbare Sorbitol-Leitfähigkeit gezeigt. Falls das Sorbitolmolekül wie PEG 300 in den Kanalbereich von PfAQP in einer *single-file* Anordnung eindringt und die Leitfähigkeit der anderen Moleküle beeinflusst, sollte eigentlich die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit in der gleichen Weise geändert werden. In der Tat ist die Hemmung durch Sorbitol für Glycerol-Leitfähigkeit deutlich schwächer als die für Wasser-Leitfähigkeit.

Hier wurde postuliert, dass sich die Bindungsstelle zwischen Sorbitol und PfAQP nicht direkt im Kanalbereich, sondern im extrazellulären Einmündungsbereich befindet. Das Sorbitolmolekül kann als die beiden vicinal liegenden G0 und G1 dar-

gestellt werden, somit das Sorbitolmolekül genau an dieser Stelle Wechselwirkung mit PfAQP hervorrufen und die Leitfähigkeitseigenschaft von PfAQP beeinflussen kann. EcGlpF hat dagegen keine solchen Bindungsstellen für Glycerol in beiden Einmündungsbereichen, so dass das Sorbitolmolekül keine direkten Einflüsse auf die Leitfähigkeit von EcGlpF ausüben kann.

Bei der Wasser-Leitfähigkeitsmessung im Sorbitol-basierten Testsystem bindet das Sorbitolmolekül an die beiden Bindungsstellen für Glycerol und damit „verstopft“ den Kanaleinmündungsbereich. Die Wassermoleküle können wegen ihrer wenigen gesamten Wasserstoffbrückbindungen mit PfAQP und fehlenden lipophilen Seitenkette nicht in den Kanal eindringen. Dadurch kann keine Wasser-Leitfähigkeit bei diesem Testsystem nachgewiesen werden.

Bei der Glycerol-Leitfähigkeitsmessung im Sorbitol-basierten Testsystem ist zwar der Kanaleinmündungsbereich von Sorbitol bedeckt, können die Glycerolmoleküle aber noch um die beiden Bindungsstellen konkurrieren und das Sorbitolmolekül verdrängen, somit zeigt PfAQP noch eine gewisse Glycerol-Leitfähigkeit.

5.3.2 Untersuchung der gemischten Solut-Leitfähigkeit von Glycerol und Harnstoff durch PfAQP

Die Idee dieser Untersuchung stammt aus dem sogenannten „anomalen Molenbruch-Verhalten“ bei einigen Ionenkanälen z. B. K^+ -Kanäle [149, 150] oder Ca^{2+} -Kanäle [151, 152]. Unter diesem Verhalten versteht man, dass sich bei Mischungen von verschiedenen unterschiedlich permeablen Ionen ein nicht-linearer Zusammenhang der Gesamtionen-Leitfähigkeit von den jeweiligen Ionen ergibt, z. B. in Abwesenheit von Ca^{2+} zeigen die Ca^{2+} -Kanäle hohe Leitfähigkeit für Na^+ , wenn man die Ca^{2+} -Konzentration erhöht, wird der Na^+ -Strom blockiert, weil Ca^{2+} selektiv an die Bindungsstellen in der Pore bindet. Bei Ca^{2+} im millimolaren Bereich steigt der Strom dann wieder an wegen des Ca^{2+} -Stroms. Es wurde postuliert, dass dieser Effekt durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von verschiedenen Ionen zu Kanälen ausgelöst wurde.

Ähnlich zu den Ionenkanälen können die Aquaglyceroporine auch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu ihren Soluten zeigen. Im Vergleich zu Harnstoff besitzt Glycerol drei Hydroxylgruppen, damit kann Glycerol mehr Wasserstoffbrückenbindungen bilden als Harnstoff. Die Computersimulation wies ebenfalls auf eine unterschiedliche Bindungsenergie von Glycerol und Harnstoff im Kanalbereich von PfAQP hin [122]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gemischte Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit von PfAQP untersucht.

5.3 Untersuchung der ungewöhnlichen Aquaglyceroporin aus *P. falciparum*

Bei einem Isoosmotischen Testsystem zeigte PfAQP eine gleiche Solut-Leitfähigkeit, egal welche Mischungsverhältnisse von den beiden Soluten im Testsystem vorlagen. Bei einem hyperosmotischen Testsystem war PfAQP gleichzeitig für den Wasserausstrom und Soluteinstrom zuständig. Es zeigte eine deutliche höhere Glycerol-Leitfähigkeit als Harnstoff (Wasser-Leitfähigkeit blieb unverändert.), mit anderen Worten PfAQP leitet selektiver Glycerol als Harnstoff unter dieser Testbedingung. Es wurde damit vermutet, dass PfAQP unter den physiologischen Bedingungen (gemischte Solute (Glycerol + Harnstoff) im wässrigen Medium) den Glycerol-Transport bevorzugt. Für den Harnstoff-Transport sind in vielen Zellen auch eigene spezielle Harnstoff-Transporter zuständig [153].

5.3.3 Fazit

- PfAQP als ein gut Wasser-leitendes Aquaglyceroporin wurde in dieser Arbeit bestätigt. EcGlpF zeigte weiterhin keine deutliche Wasser-Leitfähigkeit. Allgemein zu der Frage, ob die Aquaglyceroporine Wasser leiten können, soll weiter untersucht werden.
- Die Auswahl der Osmolyte kann die Wasser- und Solut-Leitfähigkeitsmessung von Aquaporinen bzw. Aquaglyceroporinen enorm beeinflussen.
- Neben dem engen Kanal-Bereich soll auch der Einmündungsbereich bei Untersuchung der Aqua(glycero)porine betrachtet werden.
- Unter der physiologischen Bedingung leitet PfAQP Glycerol besser als Harnstoff.

5 *Diskussion*

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, fünf ungewöhnliche Aquaporine zu untersuchen und charakterisieren.

- Strop634 und Strop1447 aus *S. tropica*
Strop634 und Strop1447 sind strukturell gesehen beide Aquaporin-Arsenatreduktase-Fusionsproteine und möglicherweise stellen sie als die nächste Evolutionsstufe der Aquaporine für die bestimmten Funktionen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die beiden Aquaporin- und Arsenatreduktase-Funktion von Strop634 in verschiedenen Testsystemen charakterisiert werden. Die arsenitselektive Aquaporin-Domäne und Arsenatreduktase-Domäne tragen zusammen zu der Arsenat-Detoxifikation in den Zellen bei und mit dieser fusionierten Form ist ein effizienter Schutzmechanismus vor dem toxischeren Enzym-Produkt Arsenit und ein energiesparender Diffusionsprozess zu erwarten.

Das ähnliche Protein Strop1447 wurde ebenfalls *in vivo* und *in vitro* untersucht und zeigte in den heterologen Expressionssystemen keine Funktionalitäten. Mittels der phänotypischen Analyse von verschiedenen *S. tropica*-Knockout-Stämmen wurde dessen Arsenatreduktase-Aktivität nachgewiesen. Für diese Enzymaktivität ist wahrscheinlich ein spezielles Redoxsystem in *S. tropica* (Mycothiol/Mycoredoxin/Mycothionreduktase-System) erforderlich.

- TgAQP2 aus *T. gondii* und EtAQP2 aus *E. tenella*
TgAQP2 und EtAQP2 beide als eine Sonderform von Aquaporinen bestehen aus jeweils zwei putativen Aquaporin-Domänen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Aquaporine als fusionierte Form und jeweiligen Domänen subkloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Die vollständige Expression aller Konstruktionen wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Die funktionelle Charakterisierung in den Hefezellen deutete auf eine fehlende Wasser-, Ammoniak- und Kalium-Leitfähigkeit hin. Eine sehr schwache Glycerol-Leitfähigkeit (TgAQP2, TgAQP2b, EtAQP2, EtAQP2b) und schwache Methyamin-Leitfähigkeit bei TgAQP2 konnten nachgewiesen

werden.

- PfAQP aus *P. falciparum*

Über die Wasser-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen sind die Meinungen sehr kontrovers. Viele experimentelle Daten zeigten keine oder schlechte Wasser-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen z. B. EcGlpF und PfAQP. In einigen Studien wurde PfAQP allerdings als eine Sonderform von Aquaglyceroporinen auf eine hohe Wasser-Leitfähigkeit hingewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PfAQP zusammen mit einem weiteren Aquaglyceroporin EcGlpF auf ihre Wasser- und Solut-Leitfähigkeit in einer Protoplasten-basierten dynamischen Lichtstreuungsmessung bei verschiedenen Osmolyten getestet. Die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP war stark von den eingesetzten Osmolyten abhängig. Bei einem Saccharose-basierten Testsystem zeigte PfAQP hohe Wasser-Leitfähigkeit. Die Wasser-Leitfähigkeit nahm ab, wenn PEG 300 und Glycerol als Osmolyt in das Testsystem eingesetzt wurden. Unter der Testbedingung mit Sorbitol zeigte PfAQP wie die Negativkontrolle keine Wasser-Leitfähigkeit durch den Kanal. Bei EcGlpF wurde, unabhängig von den eingesetzten Osmolyten, keine Wasser-Leitfähigkeit nachgewiesen. Die Glycerol-Leitfähigkeit wurde bei den beiden Aquaglyceroporinen in diesem Testsystem bestätigt. Allerdings war die Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP beim Saccharose-basierten Testsystem am höchstens und bei den anderen Osmolyten (PEG 300, Sorbitol) nahmen die Werte ab (aber nicht komplett gehemmt durch Sorbitol), während die Glycerol-Leitfähigkeit von EcGlpF bei den verschiedenen Osmolyt-Einsätzen in das Testsystem konstant blieb.

Beim Test der gemischten Solut-Leitfähigkeit (Glycerol + Harnstoff) zeigte PfAQP eine gleiche Solut-Leitfähigkeit unter einer isoosmotischen Testbedingung. Bei einer hyperosmotischen Testbedingung wurde PfAQP unter der Beteiligung von Wasserausstrom aber auf eine höhere Glycerol-Leitfähigkeit als Harnstoff-Leitfähigkeit hingewiesen.

Mit dieser Arbeit konnte die Aussage über die Wasser-Leitfähigkeit von PfAQP geeinigt werden: PfAQP ist ein gut Wasser-leitendes Aquaglyceroporin und dessen Wasser-Leitfähigkeit sowie Solut-Leitfähigkeit (Glycerol-Leitfähigkeit) können durch die eingesetzten Osmolyte im Testsystem beeinflusst werden, was auf einen neuen Aspekt von Struktur-Funktionsbeziehung der Aqua(glycero)porine außerhalb des Kanalbereiches hindeutet.

7 Summary

The purpose of this study was the investigation and characterisation of five unusual aquaporins.

- Strop634 and Strop1447 from *S. tropica*
Strop634 and Strop1447 are both structurally aquaporin-arsenate reductase fusion proteins and indicate possibly the next level of evolution of aquaporins for certain functions.

In this work, the aquaporin domain and arsenate reductase domain of Strop634 were identified and characterised in different assays. The construct of an arsenite-conducting aquaglyceroporin carrying a C-terminal arsenate reductase domain provides complete arsenate detoxification in cells. With this construct, the by the enzyme domain generated toxic arsenite can be shuttled out of the cells immediately, which on the one hand prevents accumulation of toxic arsenite, on the other hand increases the efficiency of diffusion in an energy-saving fashion.

The similarly structured Strop1447 was also tested *in vivo* and *in vitro* and neither channel permeability nor enzyme activity were shown in heterologous expression systems. Phenotypic growth assays with different knockout-strains indicated the potential arsenate reductase activity of Strop1447, which is probably correlated with mycothiol/mycoredoxin/mycothion reductase-System in *S. tropica*.

- TgAQP2 from *T. gondii* and EtAQP2 from *E. tenella*
TgAQP2 and EtAQP2 are both structurally unique aquaporins, which contain two putative aquaporin domains in their protein sequences.

In this work, both aquaporin-aquaporin fusion proteins and their respective single aquaporin domains were subcloned and the complete expression of them (two fusion proteins and four single aquaporin domains) in *S. cerevisiae* were verified with Western blot. Phenotypic growth assays in yeast indicated the absence of water, ammonia and potassium permeability. In the stopped flow assay with yeast protoplasts, low glycerol permeability by the fusion proteins TgAQP2, EtAQP2 and the domains TgAQP2b, EtAQP2b could be

7 Summary

detected, methylammonia permeability by the fusion protein TgAQP2 could also be shown in a methylammonia influx assay.

- PfAQP from *P. falciparum*

The opinions on the water permeability of the aquaglyceroporins are controversial. Numerous experimental analyses with the typical aquaglyceroporins EcGlpF and PfAQP did not indicate significant water permeability. In other studies, high water permeability of PfAQP was found.

In this work, to compare the water and glycerol permeabilities of both aquaglyceroporins PfAQP and EcGlpF in the presence of different osmolytes, i.e. sucrose, sorbitol, PEG 300 and glycerol, a yeast protoplasts based stopped flow assay was carried out. We found that the water permeability of PfAQP strongly depends on the used osmolytes, with full inhibition by sorbitol, and increasing water permeability when glycerol, PEG 300 and sucrose were used. EcGlpF did not show water permeability regardless of the used osmolytes. Glycerol permeability was detected with both aquaglyceroporins in this assay, however the glycerol permeability of PfAQP was as well affected by the used osmolytes, in sucrose with the highest glycerol permeability and inhibition in sorbitol and PEG 300 (but to a weaker extent), whereas EcGlpF conducted glycerol independently of the osmolytes.

In order to determine potential interactions of different solutes within aquaglyceroporins, a mixed solute permeability with glycerol and urea by PfAQP was tested. Under isoosmotic conditions, PfAQP indicated equal glycerol and urea permeabilities, whereas under hyperosmotic conditions in a countercurrent with water, glycerol was clearly preferred by PfAQP over urea.

In conclusion, this work has experimentally confirmed the high water permeability of PfAQP and low water permeability of EcGlpF, and explains the inhibition of water and glycerol permeabilities by sorbitol by its binding to the extracellular vestibule, which indicate a novel structure-function relationship of aqua(glycero)porins outside of the channel region.

Anhang

A.1 DNA- und Proteinsequenz von Strop634

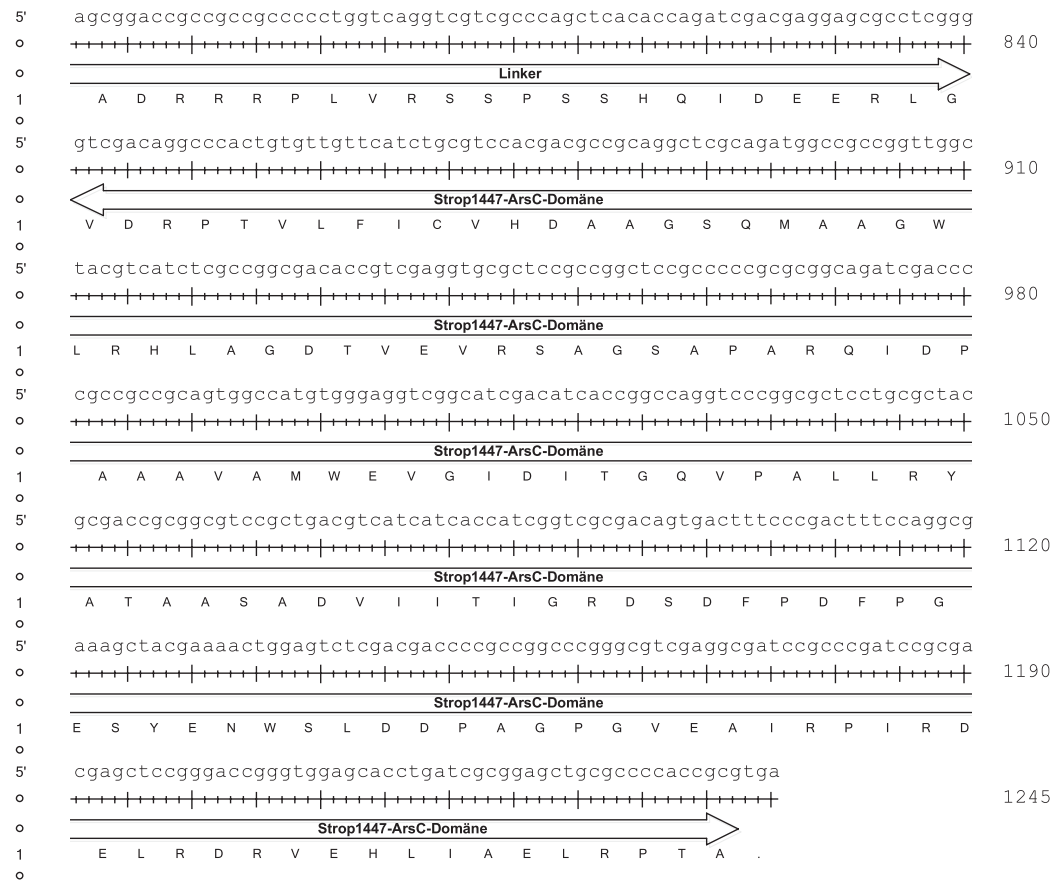
5'	atgggagagaaacagaccgatgacccccaccctgtggcgggcgctgctggccgagttcacccggcaccgccc	70
o	+	
o	← Strop634-AQP-Domäne	
1	M G E N R P M T P T L W R R L L A E F T G T A	
o		
5'	tgtctggttacccgcgtggctcggtccggcatcatggccgccaccctctccccggccgacgtcggcctgca	140
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	L L V T A V V G S G I M A A T L S P A D V G L Q	
o		
5'	gctgctgcagaactcgatcgccaccgccttcgccctcgccacgctgacccgatcttcgggcccgggtatcc	210
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	L L Q N S I A T A F A L G T L I L I F G P V S	
o		
5'	ggcgcgcacttcaaccccgctcgtctccatcgccgactgggtcctcgccgcgcgacccggcaccggcctca	280
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	G A H F N P V V S I A D W F L G R R T G T G L	
o		
5'	ccgccgcgacactggcggtctacgtcgtggcgcgaggtgctcggtgcatcgccggttcgggtcgtggcgaa	350
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	T A R D L G G Y V V A Q V L G A I A G S V L A N	
o		
5'	cctgatgttcgacctcgccgcgctcgacctctccggcaaggaccgcgcgcgggcacctgtggctcggc	420
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	L M F D L A A V D L S G K D R A A G H L W L G	
o		
5'	gaggtcgtcgccaccgcggcctgatcctgatcattttcgccctcgctcgctcggccgcgccccgatcg	490
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	E V V A T A G L I L I I F A L A R S G R A P I	
o		
5'	ctcccgccgcgctcggcgcctacatcggcgcgcgctactgggtcacctcgctcgacctcgttcgccaacc	560
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	A P A A V G A Y I G A A Y W F T S S T S F A N P	
o		
5'	ggcgcgcacccgctcgccgcgcgttcaccgataaccttcgctggcatcgccccagctccgtaccgggttc	630
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	A V T V G R A F T D T F A G I A P S S V P G F	
o		

Anhang

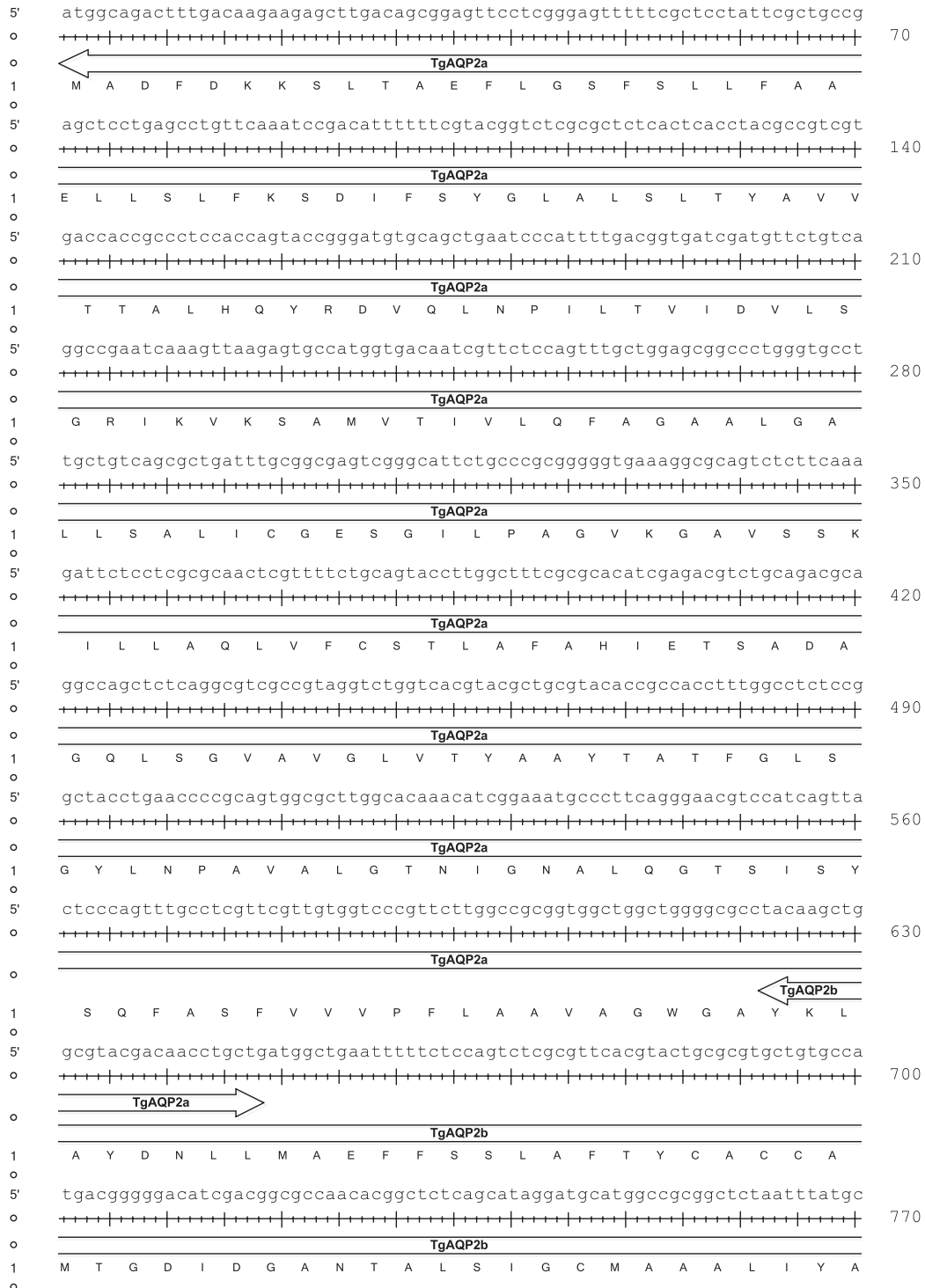
5'	gtcctcgcccaactcgtcgactcgccgtcggcgtcggtctcctggccgcgctctaccccgacgcgggc	700
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	
1	V L A Q L V G L A V G V G L L A A L Y P D A G	
o		
5'	aggccgcgaccacgtggctcgtgccctcccacgacagcgcccgcgctcgccacaacagcctccccg	770
o	+	
o	Strop634-AQP-Domäne	Linker
1	Q A A D H V V V P L P R Q R P G A R P Q Q P P R	
o		
5'	accgcacactgccgcgatctccgacgaggtccggccaaccggcccgcaatccgcactgcatgaaagg	840
o	+	
o	Linker	
1	P A P A R D L R R G S G Q P V P Q S A L H E R	
o		
5'	ctcgtgatgtccgacaagcccagcgtcctgttcgtctgctccacaacgcccggcgttcccagatggccg	910
o	+	
o	Li...r	Strop634-ArsC-Domäne
1	L V M S D K P S V L F V C V H N A G R S Q M A	
o		
5'	ccggatggctgcgccacctcgccgacacccgtcgaggtccgctccgcgcgcagcgcacccgcgaagac	980
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	A G W L R H L A G D T V E V R S A G S A P A K T	
o		
5'	cgtcaaccggccgcgctcgaggcgatgcccggaggtcgccatcgatatcaccgaccaaacccccaaactc	1050
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	V N P A A V E A M R E V G I D I T D Q T P K L	
o		
5'	ttcagtagcgcaccgcggagtcctcggacgtgatcgtcaccatgggctgcggcgacgcctgcccgctct	1120
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	F E Y A T A E S S D V I V T M G C G D A C P V	
o		
5'	ttcccggaagcgctacgaggactggaagctcgacgacctgcgcgcaagggcgctcgacgcgcgtccgcc	1190
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	F P G K R Y E D W K L D D P A G K G V D A V R P	
o		
5'	gatccgtgacgacatccgtaccgggtggagaagctcctcgccgagctgcgccccgcgcgtcgagaggtt	1260
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	I R D D I R T R V E K L L A E L R P A V G E V	
o		
5'	gaccgcgacgtagccggcgcggtgacggccaggtgcggttgctcgcgcggttgctcggtgaaggccggc	1330
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	D R D V A G G G D G Q V R L S A R L S G E G R	
o		
5'	atcttcggcccgcgccaccaatggcgtttga	1362
o	+	
o	Strop634-ArsC-Domäne	
1	H L R P G G T N G V .	
o		



Anhang



A.3 DNA- und Proteinsequenz von TgAQP2



Anhang

g
a
t
c
g
g
g
t
g
g
a
g
t
c
t
g
c
g
g
t
g
c
c
c
t
c
a
a
c
c
c
c
g
c
c
g
t
c
a
c
t
c
t
g
g
g
c
a
c
g
t
g
g
t
c
g
g
t
c
a
c
a
g
t
840

+

TgAQP2b

I G W K S G G A L N P A V T L G T L V A G H S

c
g
a
g
t
a
c
c
g
g
a
c
a
t
g
c
t
g
c
t
g
t
a
t
t
g
c
t
t
t
t
t
c
a
g
t
g
t
g
g
a
g
c
a
g
g
c
g
t
t
c
t
c
g
g
a
g
c
t
g
t
c
t
t
g
g
c
g
c
10

+

TgAQP2b

R V P D M L L Y C F F Q C G A G V L G A V L A

g
g
t
a
c
a
c
c
a
t
g
g
g
g
c
c
t
t
t
g
g
a
t
c
t
g
t
t
c
a
a
c
c
t
t
c
t
c
t
c
g
t
c
g
g
g
g
a
c
c
a
g
a
t
a
c
g
a
t
t
t
g
t
t
g
a
t
980

+

TgAQP2b

R Y T M G P L D L F N L L S S G T K R Y D L L M

g
c
t
c
t
t
c
c
t
t
t
t
c
a
g
c
a
t
g
c
t
c
c
t
c
a
t
g
g
c
c
g
c
c
t
a
c
a
t
c
t
t
g
a
c
c
t
t
c
g
g
c
g
a
c
c
t
c
t
t
c
g
g
a
c
g
c
c
c
t
1050

+

TgAQP2b

L F L F S M L L M A A Y I L T F G D L F G R P

g
c
a
g
g
c
g
c
t
g
t
g
a
t
t
g
g
g
g
c
c
g
t
t
t
a
c
a
c
a
g
t
t
t
t
c
c
a
c
t
t
g
a
t
t
t
c
c
g
c
c
a
a
g
g
c
c
g
t
c
a
c
t
c
t
c
a
a
t
g
1120

+

TgAQP2b

A G A V I G A V Y T V F H L I S A K A V T L N

t
t
c
a
a
a
c
c
g
c
c
g
t
c
g
g
c
a
t
c
a
t
c
g
t
c
a
g
c
c
a
g
t
c
c
t
c
t
t
g
a
a
c
g
g
t
t
a
c
g
c
c
g
a
a
g
a
c
t
g
g
g
g
g
a
g
c
g
c
1190

+

TgAQP2b

V Q T A V G I I V S Q L L L N G Y A E D W G S A

t
g
t
g
g
c
c
a
g
c
g
t
g
t
c
c
a
t
c
c
c
a
t
t
c
t
c
g
g
a
t
g
t
c
t
c
c
t
a
g
c
c
t
c
a
t
g
t
c
t
t
c
t
t
g
c
g
t
t
c
c
t
t
c
c
c
a
g
c
1260

+

TgAQP2b

V A S V S I P I L G C L L A S C L L A F L P S

c
a
g
t
a
c
c
a
g
a
g
a
c
a
c
g
c
g
t
g
a
1281

+

TgAQP2b

Q Y Q R H A .



Anhang

5'	ctccgggggctccctcaaccccgagtcctcgggggggcccttctgagcgagggccgcagcatatctcgc	840
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	S G G S L N P A V S G G A L L S E G R S I S R	
o		
5'	gaggtggccacagtggtggtgtttcaggtgtgcggcgcgctggctgctgcgctgctgctgctccacgtcg	910
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	E V A T V W L F Q V C G A L A A A L L L L H V	
o		
5'	gcagcagcagcagcagcagcggcgctgcagcgctgcctccggcgactggaaggccctcgccttctgcgc	980
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	G S S S S S S G A A A L A S G D W K A L A F C A	
o		
5'	agcactcagcgcaactcctcatgatctcttattgcacaaactggggcgacttcttcggctctccggcgcg	1050
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	A L S A L L M I S Y C T N W G D F F G S P A A	
o		
5'	gccgtggtggcgcggtgtacggactctccattgtgcggacgcggctgcagtgcccgtaaccccgcca	1120
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	A V V G A V Y G L S I A A D A A A V P V N P A	
o		
5'	cttctctcggagctgcttttcgcgcgttttttcaaaacgggaactttcccagacccctcgcgacgtttgc	1190
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	T S L G A A F A A F F K T G T F P D P L A T F A	
o		
5'	tgctgtgtttgtgcgggtgatcggtgcatggcgggcgccgtgctgctgcgcgcatgccttcggagtag	1260
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	A V F V P V I G C M A G A V L L R A M P S E Y	
o		
5'	cggaggcggtcttag	1275
o	+++++	
o	EtAQP2b	
1	R R R L .	
o		

A.5 Parameter für das Kurvenfitting mit Bateman-Funktion in SigmaPlot

Equation	$f=a*(1-\exp(-b*x))-(c*\exp(-d*x))$ fit f to y "fit f to y with weight reciprocal_y "fit f to y with weight reciprocal_ysquare
Variables	$x = \text{col}(1)$ 'prevmin: 0.000000 prevmax: 10.000000 $y = \text{col}(2)$ $\text{reciprocal_y} = 1/\text{abs}(y)$ $\text{reciprocal_ysquare} = 1/y^2$ 'Automatic Initial Parameter Estimate Functions $y = \text{col}(\text{first}(q)=\text{if}(\text{size}(q)<10;\text{size}(q)-1;\text{int}(0,9*\text{size}(q))))$ $y_{\text{last}}(q)=\text{mean}(q[\text{data}(\text{first}(q);\text{size}(q))])$
Initial parameters	$a = y_{\text{last}}(y)/2$ "Auto previous: 0,860672 $b = -2*\ln(,5)/(x50(x;y;,5)-\min(x))$ 'previous: 0,494124 $c = y_{\text{last}}(y)/2$ "Auto previous: -0,0396326 $d = -2*\ln(,5)/(\max(x)-x50(x;y;,5))$ 'previous: 4,18372
Constraints	$b>0$ $d>0$
Options	Iterations 200 Step size 1 Tolerance 1e-010
Trigonometric units	Degrees

Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] P. Agre, G. M. Preston, B. L. Smith, J. S. Jung, S. Raina, C. Moon, W. B. Guggino, and S. Nielsen, "Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel.," *Am J Physiol*, vol. 265, pp. F463–F476, Oct 1993.
- [2] F. J. M. Detmers, B. L. de Groot, E. M. Müller, A. Hinton, I. B. M. Konings, M. Sze, S. L. Flitsch, H. Grubmüller, and P. M. T. Deen, "Quaternary ammonium compounds as water channel blockers. specificity, potency, and site of action.," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 14207–14214, May 2006.
- [3] R. Zardoya, "Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family.," *Biol Cell*, vol. 97, pp. 397–414, Jun 2005.
- [4] K. B. Heller, E. C. Lin, and T. H. Wilson, "Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*.," *J Bacteriol*, vol. 144, pp. 274–278, Oct 1980.
- [5] M. J. Borgnia and P. Agre, "Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, pp. 2888–2893, Feb 2001.
- [6] M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, and P. Agre, "Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels.," *Annu Rev Biochem*, vol. 68, pp. 425–458, 1999.
- [7] T. P. Jahn, A. L. B. Møller, T. Zeuthen, L. M. Holm, D. A. Klaerke, B. Mohsin, W. Kühlbrandt, and J. K. Schjoerring, "Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia.," *FEBS Lett*, vol. 574, pp. 31–36, Sep 2004.
- [8] Z. Liu, J. Shen, J. M. Carbrey, R. Mukhopadhyay, P. Agre, and B. P. Rosen, "Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, pp. 6053–6058, Apr 2002.
- [9] B. L. Smith and P. Agre, "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins.," *J Biol Chem*, vol. 266, pp. 6407–6415, Apr 1991.

- [10] T. Walz, B. L. Smith, P. Agre, and A. Engel, “The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP.,” *EMBO J*, vol. 13, pp. 2985–2993, Jul 1994.
- [11] N. Uehlein, C. Lovisolo, F. Siefritz, and R. Kaldenhoff, “The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions.,” *Nature*, vol. 425, pp. 734–737, Oct 2003.
- [12] G. V. Prasad, L. A. Coury, F. Finn, and M. L. Zeidel, “Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO₂ across membranes.,” *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 33123–33126, Dec 1998.
- [13] Y. Wang and E. Tajkhorshid, “Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4.,” *Proteins*, vol. 78, pp. 661–670, Feb 2010.
- [14] B. Yang, N. Fukuda, A. van Hoek, M. A. Matthay, T. Ma, and A. S. Verkman, “Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes.,” *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 2686–2692, Jan 2000.
- [15] A. S. Verkman, “Does aquaporin-1 pass gas? An opposing view.,” *J Physiol*, vol. 542, p. 31, Jul 2002.
- [16] J. H. Park and M. Saier, Jr, “Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins.,” *J Membr Biol*, vol. 153, pp. 171–180, Oct 1996.
- [17] L. S. King, D. Kozono, and P. Agre, “From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology.,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 5, pp. 687–698, Sep 2004.
- [18] H. Sui, B. G. Han, J. K. Lee, P. Walian, and B. K. Jap, “Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.,” *Nature*, vol. 414, no. 6866, pp. 872–878, 2001.
- [19] D. Wree, B. Wu, T. Zeuthen, and E. Beitz, “Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion.,” *FEBS J*, vol. 278, pp. 740–748, Mar 2011.
- [20] E. Kruse, N. Uehlein, and R. Kaldenhoff, “The aquaporins.,” *Genome Biol*, vol. 7, no. 2, p. 206, 2006.
- [21] Y. Wang and E. Tajkhorshid, “Molecular mechanisms of conduction and selectivity in aquaporin water channels.,” *J Nutr*, vol. 137, pp. 1509S–1515S; discussion 1516S–1517S, Jun 2007.

- [22] T. Walz, Y. Fujiyoshi, and A. Engel, “The AQP structure and functional implications.,” *Handb Exp Pharmacol*, vol. 190, no. 190, pp. 31–56, 2009.
- [23] H. Li, H. Chen, C. Steinbronn, B. Wu, E. Beitz, T. Zeuthen, and G. A. Voth, “Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of aquaporin-1.,” *J Mol Biol*, vol. 407, pp. 607–620, Apr 2011.
- [24] P. Agre and D. Kozono, “Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases.,” *FEBS Lett*, vol. 555, pp. 72–78, Nov 2003.
- [25] B. Wu and E. Beitz, “Aquaporins with selectivity for unconventional permeants.,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 64, pp. 2413–2421, Sep 2007.
- [26] E. Beitz, D. Becker, J. von Bülow, C. Conrad, N. Fricke, A. Geadkaew, D. Krenc, J. Song, D. Wree, and B. Wu, “In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity.,” *Handb Exp Pharmacol*, vol. 190, pp. 77–92, 2009.
- [27] R. M. Stroud, P. Nollert, and L. Miercke, “The glycerol facilitator GlpF its aquaporin family of channels, and their selectivity.,” *Adv Protein Chem*, vol. 63, pp. 291–316, 2003.
- [28] G. M. Preston, J. S. Jung, W. B. Guggino, and P. Agre, “The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel.,” *J Biol Chem*, vol. 268, pp. 17–20, Jan 1993.
- [29] R. Zhang, A. N. van Hoek, J. Biwersi, and A. S. Verkman, “A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k.,” *Biochemistry*, vol. 32, pp. 2938–2941, Mar 1993.
- [30] E. Beitz, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Yasui, P. Agre, and J. Schultz, “Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 1153–1158, Feb 2004.
- [31] L. A. Maldonado, W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull, and M. Goodfellow, “*Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae.,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 55, pp. 1759–1766, Sep 2005.
- [32] T. A. M. Gulder and B. S. Moore, “Salinosporamide natural products: Potent 20S proteasome inhibitors as promising cancer chemotherapeutics.,” *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 49, pp. 9346–9367, Dec 2010.
- [33] G. O. Buchanan, P. G. Williams, R. H. Feling, C. A. Kauffman, P. R. Jensen,

- and W. Fenical, "Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*.,", *Org Lett*, vol. 7, pp. 2731–2734, Jun 2005.
- [34] Y. Aotani, H. Nagata, and M. Yoshida, "Lymphostin (LK6-A), a novel immunosuppressant from *Streptomyces* sp. KY11783: structural elucidation.,", *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 50, pp. 543–545, Jul 1997.
- [35] D. W. Udvary, L. Zeigler, R. N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P. R. Jensen, and B. S. Moore, "Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*.,", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 10376–10381, Jun 2007.
- [36] R. S. Oremland and J. F. Stolz, "The ecology of arsenic.,", *Science*, vol. 300, pp. 939–944, May 2003.
- [37] S. R. Adamson and K. J. Stevenson, "Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli* with a bifunctional arsenoxide: selective inactivation of lipoamide dehydrogenase.,", *Biochemistry*, vol. 20, pp. 3418–3424, Jun 1981.
- [38] M. Luthman and A. Holmgren, "Glutaredoxin from calf thymus. Purification to homogeneity.,", *J Biol Chem*, vol. 257, pp. 6686–6690, Jun 1982.
- [39] H. Luecke and F. A. Quiocho, "High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds.,", *Nature*, vol. 347, pp. 402–406, Sep 1990.
- [40] S. A. Moore, D. M. Moennich, and M. J. Gresser, "Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles.,", *J Biol Chem*, vol. 258, pp. 6266–6271, May 1983.
- [41] B. P. Rosen, "Biochemistry of arsenic detoxification.,", *FEBS Lett*, vol. 529, pp. 86–92, Oct 2002.
- [42] M. Bun-ya, K. Shikata, S. Nakade, C. Yompakdee, S. Harashima, and Y. Oshima, "Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.,", *Curr Genet*, vol. 29, pp. 344–351, Mar 1996.
- [43] H. Rosenberg, R. G. Gerdes, and K. Chegwidden, "Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*.,", *J Bacteriol*, vol. 131, pp. 505–511, Aug 1977.
- [44] O. I. Sanders, C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen, "Antimo-

- nite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*,” *J Bacteriol*, vol. 179, pp. 3365–3367, May 1997.
- [45] K. L. Oden, T. B. Gladysheva, and B. P. Rosen, “Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione,” *Mol Microbiol*, vol. 12, pp. 301–306, Apr 1994.
 - [46] S. Dey and B. P. Rosen, “Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein,” *J Bacteriol*, vol. 177, pp. 385–389, Jan 1995.
 - [47] M. Ghosh, J. Shen, and B. P. Rosen, “Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, pp. 5001–5006, Apr 1999.
 - [48] H.-C. Yang, J. Cheng, T. M. Finan, B. P. Rosen, and H. Bhattacharjee, “Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*,” *J Bacteriol*, vol. 187, pp. 6991–6997, Oct 2005.
 - [49] K. B. Payne and T. M. Abdel-Fattah, “Adsorption of arsenate and arsenite by iron-treated activated carbon and zeolites: effects of pH, temperature, and ionic strength,” *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, vol. 40, no. 4, pp. 723–749, 2005.
 - [50] R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, L. T. Phung, and S. Silver, “Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 26, pp. 311–325, Aug 2002.
 - [51] B. P. Rosen, “Families of arsenic transporters,” *Trends Microbiol*, vol. 7, pp. 207–212, May 1999.
 - [52] A. Ajees, J. Yang, and B. P. Rosen, “The ArsD As(III) metallochaperone,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 391–399, Jun 2011.
 - [53] X. Ruan, H. Bhattacharjee, and B. P. Rosen, “Cys-113 and Cys-422 form a high affinity metalloid binding site in the ArsA ATPase,” *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 9925–9934, Apr 2006.
 - [54] Y.-L. Meng, Z. Liu, and B. P. Rosen, “As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*,” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 18334–18341, Apr 2004.
 - [55] P. Martin, S. DeMel, J. Shi, T. Gladysheva, D. L. Gatti, B. P. Rosen, and B. F. Edwards, “Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme,” *Structure*, vol. 9, pp. 1071–1081, Nov 2001.

- [56] J. Liu, T. B. Gladysheva, L. Lee, and B. P. Rosen, "Identification of an essential cysteinyl residue in the ArsC arsenate reductase of plasmid R773.," *Biochemistry*, vol. 34, pp. 13472–13476, Oct 1995.
- [57] J. Shi, A. Vlamis-Gardikas, F. Aslund, A. Holmgren, and B. P. Rosen, "Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction.," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 36039–36042, Dec 1999.
- [58] T. B. Gladysheva, K. L. Oden, and B. P. Rosen, "Properties of the arsenate reductase of plasmid R773.," *Biochemistry*, vol. 33, pp. 7288–7293, Jun 1994.
- [59] J. Messens, J. C. Martins, I. Zegers, K. Van Belle, E. Brosens, and L. Wyns, "Purification of an oxidation-sensitive enzyme, pI258 arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*.,," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 790, pp. 217–227, Jun 2003.
- [60] J. Messens, I. Van Molle, P. Vanhaesebrouck, M. Limbourg, K. Van Belle, K. Wahni, J. C. Martins, R. Loris, and L. Wyns, "How thioredoxin can reduce a buried disulphide bond.,," *J Mol Biol*, vol. 339, pp. 527–537, Jun 2004.
- [61] G. Ji, E. A. Garber, L. G. Armes, C. M. Chen, J. A. Fuchs, and S. Silver, "Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258.," *Biochemistry*, vol. 33, pp. 7294–7299, Jun 1994.
- [62] I. Zegers, J. C. Martins, R. Willem, L. Wyns, and J. Messens, "Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty.,," *Nat Struct Biol*, vol. 8, pp. 843–847, Oct 2001.
- [63] R. Mukhopadhyay, J. Shi, and B. P. Rosen, "Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase.,," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 21149–21157, Jul 2000.
- [64] R. Mukhopadhyay and B. P. Rosen, "Saccharomyces cerevisiae ACR2 gene encodes an arsenate reductase.,," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 168, pp. 127–136, Nov 1998.
- [65] R. Mukhopadhyay and B. P. Rosen, "The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase.,," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 34738–34742, Sep 2001.
- [66] J. M. Denu and J. E. Dixon, "A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases.,," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, pp. 5910–5914, Jun 1995.
- [67] R. Mukhopadhyay, Y. Zhou, and B. P. Rosen, "Directed evolution of a

- yeast arsenate reductase into a protein-tyrosine phosphatase.," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 24476–24480, Jul 2003.
- [68] T. R. Radabaugh and H. V. Aposhian, "Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase.," *Chem Res Toxicol*, vol. 13, pp. 26–30, Jan 2000.
- [69] E. Ordóñez, K. Van Belle, G. Roos, S. De Galan, M. Letek, J. A. Gil, L. Wyns, L. M. Mateos, and J. Messens, "Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange.," *J Biol Chem*, vol. 284, pp. 15107–15116, May 2009.
- [70] G. L. Newton, N. Buchmeier, and R. C. Fahey, "Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria.," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 72, pp. 471–494, Sep 2008.
- [71] A. Porquet and M. Filella, "Structural evidence of the similarity of Sb(OH)₃ and As(OH)₃ with glycerol: implications for their uptake.," *Chem Res Toxicol*, vol. 20, pp. 1269–1276, Sep 2007.
- [72] R. Wysocki, C. C. Chéry, D. Wawrzycka, M. Van Hulle, R. Cornelis, J. M. Thevelein, and M. J. Tamás, "The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*.," *Mol Microbiol*, vol. 40, pp. 1391–1401, Jun 2001.
- [73] S. K. Acharyya, P. Chakraborty, S. Lahiri, B. C. Raymahashay, S. Guha, and A. Bhowmik, "Arsenic poisoning in the Ganges delta.," *Nature*, vol. 401, pp. 545; discussion 546–545; discussion 547, Oct 1999.
- [74] R. B. Williams, "Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens.," *Int J Parasitol*, vol. 28, pp. 1089–1098, Jul 1998.
- [75] K. Kirk, "Channels and transporters as drug targets in the *Plasmodium*-infected erythrocyte.," *Acta Trop*, vol. 89, pp. 285–298, Feb 2004.
- [76] E. Beitz, "Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy.," *Biol Cell*, vol. 97, pp. 373–383, Jun 2005.
- [77] S. Pavlovic-Djuranovic, J. E. Schultz, and E. Beitz, "A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins.," *FEBS Lett*, vol. 555, pp. 500–504, Dec 2003.
- [78] K. Miranda, D. A. Pace, R. Cintron, J. C. F. Rodrigues, J. Fang, A. Smith, P. Rohloff, E. Coelho, F. de Haas, W. de Souza, I. Coppens, L. D. Sibley, and

- S. N. J. Moreno, "Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole.," *Mol Microbiol*, vol. 76, pp. 1358–1375, Jun 2010.
- [79] M. Hansen, J. Kun, J. Schultz, and E. Beitz, "A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites.," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 4874–4882, Feb 2002.
- [80] S. Pavlovic-Djuranovic, J. F. J. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz, "Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium aquaglyceroporin* inhibit parasite proliferation.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1758, pp. 1012–1017, Aug 2006.
- [81] Z. E. R. Newby, J. O'Connell, 3rd, Y. Robles-Colmenares, S. Khademi, L. J. Miercke, and R. M. Stroud, "Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*.," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 15, pp. 619–625, Jun 2008.
- [82] K. Hedfalk, N. Pettersson, F. Oberg, S. Hohmann, and E. Gordon, "Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin.," *Protein Expr Purif*, vol. 59, pp. 69–78, May 2008.
- [83] A. S. Verkman, "Water permeability measurement in living cells and complex tissues.," *J Membr Biol*, vol. 173, pp. 73–87, Jan 2000.
- [84] G. Soveral, A. Madeira, M. C. Loureiro-Dias, and T. F. Moura, "Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, pp. 2341–2343, Apr 2007.
- [85] D. Hanahan, "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.," *J Mol Biol*, vol. 166, pp. 557–580, Jun 1983.
- [86] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, and J. M. Short, "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection," *Biotechniques*, vol. 5, no. Bullock, pp. 376–379, 1987.
- [87] G. Calamita, B. Kempf, M. Bonhivers, W. R. Bishai, E. Bremer, and P. Agre, "Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 3627–3631, Mar 1998.
- [88] Y. Abed, A. Davin, R. N. Charrel, C. Bollet, and P. Micco, "Variation of RAPD-fingerprint patterns using different DNA-extraction methods with Gram-positive bacteria," *WORLD J MICROB BIOT*, vol. 11, pp. 238–239, 1995. 10.1007/BF00704659.

- [89] S. N. Cohen, A. C. Chang, and L. Hsu, “Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 69, pp. 2110–2114, Aug 1972.
- [90] C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller, “One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, pp. 2172–2175, Apr 1989.
- [91] B. Wu, K. Altmann, I. Barzel, S. Krehan, and E. Beitz, “A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors.,” *Pflugers Arch*, vol. 456, pp. 717–720, Jul 2008.
- [92] A. M. Marini, S. Vissers, A. Urrestarazu, and B. André, “Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.,” *EMBO J*, vol. 13, pp. 3456–3463, Aug 1994.
- [93] E. Beitz, “Subfamily logos: visualization of sequence deviations at alignment positions with high information content.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 7, p. 313, 2006.
- [94] J. A. Anderson, S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas, and R. F. Gaber, “Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp. 3736–3740, May 1992.
- [95] H. Bihler, C. L. Slayman, and A. Bertl, “Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel.,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1558, pp. 109–118, Feb 2002.
- [96] A. Rodríguez-Navarro and J. Ramos, “Dual for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*.,” *J Bacteriol*, vol. 159, pp. 940–945, Sep 1984.
- [97] N. L. Uzcategui, A. Szallies, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Palmada, K. Figarella, C. Boehmer, F. Lang, E. Beitz, and M. Duszenko, “Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*.,” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 42669–42676, Oct 2004.
- [98] A. Bertl, H. Bihler, C. Kettner, and C. L. Slayman, “Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Pflugers Arch*, vol. 436, pp. 999–1013, Nov 1998.
- [99] A. Bertl and R. Kaldenhoff, “Function of a separate NH₃-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat.,” *FEBS Lett*, vol. 581, pp. 5413–5417, Nov 2007.

- [100] R. Quigley, N. Gupta, A. Lisec, and M. Baum, "Maturation changes in rabbit renal basolateral membrane vesicle osmotic water permeability.," *J Membr Biol*, vol. 174, pp. 53–58, Mar 2000.
- [101] B. Wu, J. Song, and E. Beitz, "Novel channel enzyme fusion proteins confer arsenate resistance.," *J Biol Chem*, vol. 285, pp. 40081–40087, Dec 2010.
- [102] J. Song, B. Wu, and E. Beitz, "Functional and evolutionary implications of natural channel-enzyme fusion proteins.," *BioMol Concepts*, vol. 2, pp. 439–444, 2011.
- [103] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, pp. 6640–6645, Jun 2000.
- [104] C. H. Williams, L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P. F. Wang, D. M. Veine, K. Becker, and R. H. Schirmer, "Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved.," *Eur J Biochem*, vol. 267, pp. 6110–6117, Oct 2000.
- [105] G. Waksman, T. S. Krishna, C. Williams, Jr, and J. Kuriyan, "Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis.," *J Mol Biol*, vol. 236, pp. 800–816, Feb 1994.
- [106] C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, and M. P. Rigobello, "Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells.," *Free Radic Biol Med*, vol. 42, pp. 872–881, Mar 2007.
- [107] J. Messens, J. C. Martins, E. Brosens, K. Van Belle, D. M. Jacobs, R. Willem, and L. Wyns, "Kinetics and active site dynamics of *Staphylococcus aureus* arsenate reductase.," *J Biol Inorg Chem*, vol. 7, pp. 146–156, Jan 2002.
- [108] G.-L. Duan, Y. Zhou, Y.-P. Tong, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, and Y.-G. Zhu, "A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase.," *New Phytol*, vol. 174, no. 2, pp. 311–321, 2007.
- [109] Y. Zhou, H. Bhattacharjee, and R. Mukhopadhyay, "Bifunctional role of the leishmanial antimonate reductase LmACR2 as a protein tyrosine phosphatase.," *Mol Biochem Parasitol*, vol. 148, pp. 161–168, Aug 2006.
- [110] R. Li, J. D. Haile, and P. J. Kennelly, "An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics.," *J Bacteriol*, vol. 185, pp. 6780–6789, Dec 2003.

- [111] R. Mukhopadhyay, D. Bisacchi, Y. Zhou, A. Armirotti, and D. Bordo, “Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from *Leishmania major*,” *J Mol Biol*, vol. 386, pp. 1229–1239, Mar 2009.
- [112] H. Bhattacharjee, R. Mukhopadhyay, S. Thiyagarajan, and B. P. Rosen, “Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids,” *J Biol*, vol. 7, no. 9, p. 33, 2008.
- [113] J. A. H. Danielson and U. Johanson, “Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*,” *BMC Plant Biol*, vol. 8, p. 45, 2008.
- [114] M. Ikeda, E. Beitz, D. Kozono, W. B. Guggino, P. Agre, and M. Yasui, “Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63,” *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 39873–39879, Oct 2002.
- [115] A. Beebo, D. Thomas, C. Der, L. Sanchez, N. Leborgne-Castel, F. Marty, B. Schoefs, and K. Bouhidel, “Life with and without attip1;1, an arabidopsis aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles,” *Plant Mol Biol*, vol. 70, pp. 193–209, May 2009.
- [116] D. Loqué, U. Ludewig, L. Yuan, and N. von Wiré n, “Tonoplast intrinsic proteins attip2;1 and attip2;3 facilitate nh3 transport into the vacuole,” *Plant Physiol*, vol. 137, pp. 671–680, Feb 2005.
- [117] A. Montalvetti, P. Rohloff, and R. Docampo, “A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *trypanosoma cruzi*,” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 38673–38682, Sep 2004.
- [118] K. Figarella, N. L. Uzcategui, Y. Zhou, A. LeFurgey, M. Ouellette, H. Bhattacharjee, and R. Mukhopadhyay, “Biochemical characterization of *leishmania major* aquaglyceroporin lmaqp1: possible role in volume regulation and osmotaxis,” *Mol Microbiol*, vol. 65, pp. 1006–1017, Aug 2007.
- [119] B. Wu, C. Steinbronn, M. Alsterfjord, T. Zeuthen, and E. Beitz, “Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel,” *EMBO J*, vol. 28, pp. 2188–2194, Aug 2009.
- [120] J. Song, A. Almasalmeh, D. Krenc, and E. Beitz, “Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium* aquaglyceroporin but not that of *E. coli*: Involvement of the channel vestibules,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1818, pp. 1218–1224, May 2012.

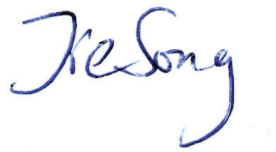
- [121] M. Hashido, M. Ikeguchi, and A. Kidera, “Comparative simulations of aquaporin family: AQP1, AQPZ, AQP0 and GlpF.,” *FEBS Lett*, vol. 579, pp. 5549–5552, Oct 2005.
- [122] C. Aponte-Santamaría, J. S. Hub, and B. L. de Groot, “Dynamics and energetics of solute permeation through the Plasmodium falciparum aquaglyceroporin.,” *Phys Chem Chem Phys*, vol. 12, pp. 10246–10254, Sep 2010.
- [123] D. Fu, A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, and R. M. Stroud, “Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity.,” *Science*, vol. 290, pp. 481–486, Oct 2000.
- [124] D. F. Savage, J. D. O’Connell, 3rd, L. J. W. Miercke, J. Finer-Moore, and R. M. Stroud, “Structural context shapes the aquaporin selectivity filter.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, pp. 17164–17169, Oct 2010.
- [125] V. Lagrée, I. Pellerin, J. F. Hubert, F. Tacnet, F. Le Cahérec, N. Roudier, D. Thomas, J. Gouranton, and S. Deschamps, “A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in xenopus oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes.,” *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 12422–12426, May 1998.
- [126] M. D. Gardner and R. Scott, “Age- and sex-related reference ranges for eight plasma constituents derived from randomly selected adults in a Scottish new town.,” *J Clin Pathol*, vol. 33, pp. 380–385, Apr 1980.
- [127] A. W. Sim, J. W. de Vries, and J. E. Vincent, “Concentrations of glycerol and non-esterified fatty acids in plasma during fat mobilization.,” *Biochem J*, vol. 92, pp. 590–593, Sep 1964.
- [128] E. Beitz, “T(E)Xtopo: shaded membrane protein topology plots in LAT(E)X2epsilon.,” *Bioinformatics*, vol. 16, pp. 1050–1051, Nov 2000.
- [129] C. Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London, UK: John Murray, 1st edition ed., 1859.
- [130] A. J. Lotka, “Contribution to the Energetics of Evolution.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 8, pp. 147–151, Jun 1922.
- [131] M. J. Nadler, M. C. Hermosura, K. Inabe, A. L. Perraud, Q. Zhu, A. J. Stokes, T. Kurosaki, J. P. Kinet, R. Penner, A. M. Scharenberg, and A. Fleig, “LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability.,” *Nature*, vol. 411, pp. 590–595, May 2001.
- [132] C. Schmitz, A.-L. Perraud, C. O. Johnson, K. Inabe, M. K. Smith, R. Penner,

- T. Kurosaki, A. Fleig, and A. M. Scharenberg, "Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7.," *Cell*, vol. 114, pp. 191–200, Jul 2003.
- [133] Y. Sano, K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime, and K. Furuichi, "Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2.," *Science*, vol. 293, pp. 1327–1330, Aug 2001.
- [134] C. Yanofsky and E. S. Lennox, "Transduction and recombination study of linkage relationships among the genes controlling tryptophan synthesis in *Escherichia coli*.,," *Virology*, vol. 8, pp. 425–447, Aug 1959.
- [135] D. V. Parke and R. T. Williams, "Metabolism of toxic substances.,," *Br Med Bull*, vol. 25, pp. 256–262, Sep 1969.
- [136] J. B. Thoden, H. M. Holden, G. Wesenberg, F. M. Raushel, and I. Rayment, "Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product.,," *Biochemistry*, vol. 36, pp. 6305–6316, May 1997.
- [137] L. F. Barros and C. Martínez, "An enquiry into metabolite domains.,," *Biophys J*, vol. 92, pp. 3878–3884, Jun 2007.
- [138] H. P. Kao, J. R. Abney, and A. S. Verkman, "Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm.,," *J Cell Biol*, vol. 120, pp. 175–184, Jan 1993.
- [139] A. L. Perraud, A. Fleig, C. A. Dunn, L. A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. J. Stokes, Q. Zhu, M. J. Bessman, R. Penner, J. P. Kinet, and A. M. Scharenberg, "ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology.,," *Nature*, vol. 411, pp. 595–599, May 2001.
- [140] L. W. Runnels, L. Yue, and D. E. Clapham, "TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities.,," *Science*, vol. 291, pp. 1043–1047, Feb 2001.
- [141] J. H. Weber, A. Vishnyakov, K. Hambach, A. Schultz, J. E. Schultz, and J. U. Linder, "Adenylyl cyclases from *Plasmodium*, *Paramecium* and *Tetrahymena* are novel ion channel/enzyme fusion proteins.,," *Cell Signal*, vol. 16, pp. 115–125, Jan 2004.
- [142] G. L. Newton, P. R. Jensen, J. B. Macmillan, W. Fenical, and R. C. Fahey, "An N-acyl homolog of mycothiol is produced in marine actinomycetes.,," *Arch Microbiol*, vol. 190, pp. 547–557, Nov 2008.
- [143] D. Fotiadis, P. Jenö, T. Mini, S. Wirtz, S. A. Müller, L. Frayssé, P. Kjellbom,

- and A. Engel, "Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes.," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 1707–1714, Jan 2001.
- [144] E. Zelazny, J. W. Borst, M. Muylaert, H. Batoko, M. A. Hemminga, and F. Chaumont, "FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 12359–12364, Jul 2007.
- [145] Y. Wang, J. Cohen, W. F. Boron, K. Schulten, and E. Tajkhorshid, "Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics.," *J Struct Biol*, vol. 157, pp. 534–544, Mar 2007.
- [146] J. Yu, A. J. Yool, K. Schulten, and E. Tajkhorshid, "Mechanism of gating and ion conductivity of a possible tetrameric pore in aquaporin-1.," *Structure*, vol. 14, pp. 1411–1423, Sep 2006.
- [147] C. Maurel, J. Reizer, J. I. Schroeder, M. J. Chrispeels, and M. Saier, Jr, "Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes.," *J Biol Chem*, vol. 269, pp. 11869–11872, Apr 1994.
- [148] M. Brändén, S. R. Tabaei, G. Fischer, R. Neutze, and F. Höök, "Refractive-index-based screening of membrane-protein-mediated transfer across biological membranes.," *Biophys J*, vol. 99, pp. 124–133, Jul 2010.
- [149] G. Eisenman, R. Latorre, and C. Miller, "Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca^{++} -activated K^{+} channel from skeletal muscle.," *Biophys J*, vol. 50, pp. 1025–1034, Dec 1986.
- [150] S. Ye, Y. Li, and Y. Jiang, "Novel insights into K^{+} selectivity from high-resolution structures of an open K^{+} channel pore.," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 17, pp. 1019–1023, Aug 2010.
- [151] C. Miller, "Ionic hopping defended.," *J Gen Physiol*, vol. 113, pp. 783–787, Jun 1999.
- [152] D. Gillespie and D. Boda, "The anomalous mole fraction effect in calcium channels: a measure of preferential selectivity.," *Biophys J*, vol. 95, pp. 2658–2672, Sep 2008.
- [153] E. J. Levin, M. Quick, and M. Zhou, "Crystal structure of a bacterial homologue of the kidney urea transporter.," *Nature*, vol. 462, pp. 757–761, Dec 2009.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Diese Arbeit hat weder ganz, noch in Teilen, bereits an anderer Stelle einer Prüfungskommission zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegen. Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit gemäß der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde.

A handwritten signature in blue ink, reading "He Song". The signature is written in a cursive style with a large, stylized 'H' and 'S'.

Kiel, April 2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in seinem Arbeitskreis sowie für die gute Betreuung möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen und Angehörigen des Instituts und bei meinen Kollegen für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Binghua Wu für eine geduldige Einführung in die Molekularbiologie und für viele wertvolle Ratschläge die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein weiteres Dankschön geht an meinem Kollegen Dawid, nicht nur für viele Diskussionen im Labor, sondern auch für viele Anregungen in der Freizeit.

Vielen Dank Nasser für das Korrekturlesen und die angenehme Zusammenarbeit mit den Protoplasten und den Stopped-Flow-Messungen.

Mein Dank gilt auch Björn und Susan für ihre technische Unterstützung bei der Primersynthese und der Sequenzierung.

Diese Arbeit sei meiner ganzen Familie gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jie Song
Geburtsdatum	26. Januar 1979
Geburtsort	Shanghai, V.R. China
Staatsangehörigkeit	chinesisch

Schulausbildung

1986-1991	Grundschule Zhiyuan Lu, Shanghai, V.R. China
1991-1994	Mittelschule Zhijian, Shanghai, V.R. China
1994-1997	Oberschule Xinzhong, Shanghai, V.R. China

Studium

1997-2000	Studium der Pharmazie an der medizinischen Universität Shanghai, Shanghai, V.R. China
2000-2001	Studium der Pharmazie an der Fudan Universität, Shanghai, V.R. China
2003-2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
08/2005	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2007	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/2007-08/2008	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: „Klonierung und Charakterisierung von zwei Aquaporinen mit Arsenatreduktase-Domänen aus <i>Salinispora Tropica</i> “ unter Anleitung von Prof. Dr. Eric Beitz am Pharmazeutische Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Promotion

09/2008-06/2012	Promotion zum Thema: „Untersuchung einiger ungewöhnlicher Aquaporine aus <i>Salinispora tropica</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Eimeria tenella</i> und <i>Plasmodium falciparum</i> “ unter Anleitung von Prof. Dr. Eric Beitz am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
-----------------	--

Publikationen

E. Beitz, D. Becker, J. von Bülow, C. Conrad, N. Fricke, A. Geadkaew, D. Krenc, J. Song, D. Wree, and B. Wu, “In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity.,” *Handb Exp Pharmacol*, vol. 190, pp. 77–92, 2009.

B. Wu, J. Song, and E. Beitz, “Novel channel enzyme fusion proteins confer arsenate resistance.,” *J Biol Chem*, vol. 285, pp. 40081–40087, Dec 2010.

J. Song, B. Wu, and E. Beitz, “Functional and evolutionary implications of natural channel-enzyme fusion proteins.,” *BioMol Concepts*, vol. 2, pp. 439–444, 2011.

J. Song, A. Almasalmeh, D. Krenc, and E. Beitz, “Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the plasmodium aquaglyceroporin but not that of *E. coli*: Involvement of the channel vestibules.,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1818, pp. 1218–1224, May 2012.